



# Curso sobre los aspectos



# más concretos y aplicados de métodos de fitopatología que apoyan el mejoramiento genético de cultivos



29 Marzo de 2012  
CIAT Santa Cruz,  
Bolivia

Dr. Michel José Vales  
CIRAD-BGPI

[michel.vales@yahoo.fr](mailto:michel.vales@yahoo.fr)

UMR - BGPI  
Biologie et Génétique  
des Interactions Plante-Parasite

© Copy right



UMR - BGPI  
Biologie et Génétique  
des Interactions Plante-Parasite

Para solicitar autorizaciones de copia completa o parcial de este curso  
por favor contactar

❑ en Bolivia el Dr Michel José Vales

❑ en Francia el Dr Philippe Rott

[michel.vales@yahoo.fr](mailto:michel.vales@yahoo.fr) o

[philippe.rott@cirad.fr](mailto:philippe.rott@cirad.fr)

Gracias



# Introducción: Marco, principio y contenido del curso sobre métodos de fitopatología

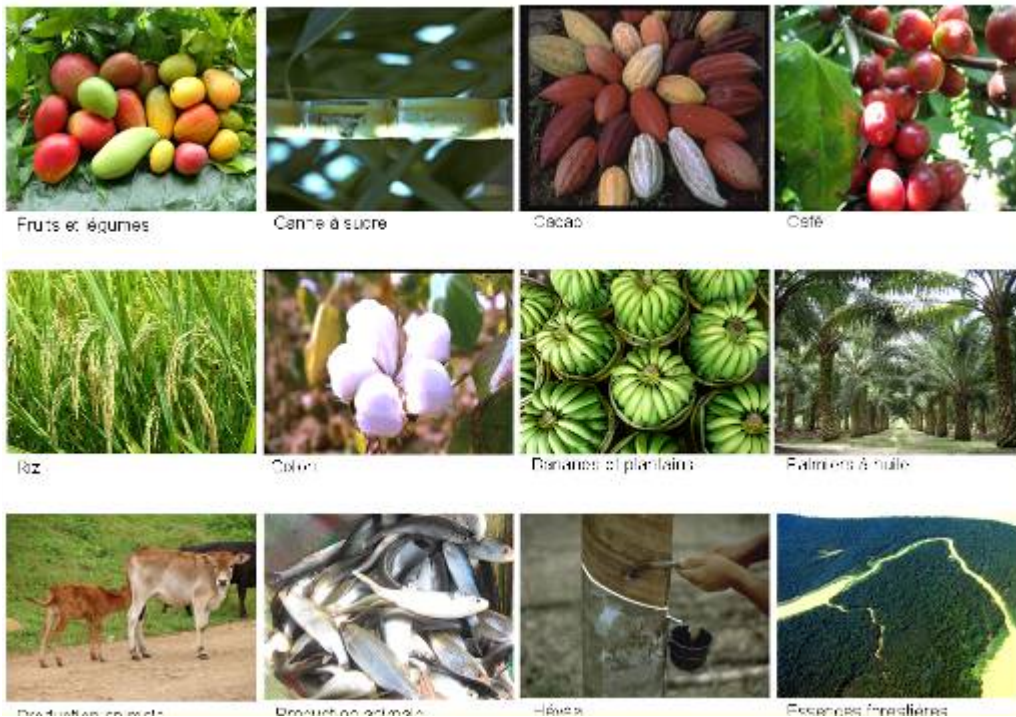
## 1. CIRAD-BIOS-UMR BGPI

- ❑ CIRAD (Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo) tiene
  - una plantilla de 1.800 personas
  - entre ellas son 850 científicos
  - de los cuales 100 trabajan en el ultramar francés y 200 en el extranjero, sobre 5 continentes y más de 50 países.



❑ El CIRAD tiene 37 Unidades de Investigación distribuidas en 3 departamentos:

- BIOS                      Sistemas Biológicos
- PERSYT                Funcionamiento de Sistemas de Producción y de Transformación Tropicales
- ES                        Medio Ambiente y sociedades





❑ BIOS tiene 12 Unidades de Investigación como

- BGPI Biología y Genética de las Interacciones Planta-Parasito



UMR - BGPI  
Biologie et Génétique  
des Interactions Plante-Parasite

## ❑ BGPI

Es una UMR (Unidad Mixta de Investigación) que agrupa investigadores de

- CIRAD
- INRA (Instituto Nacional de la Investigación Agronómica)
- SupAgroM (Escuela Superior Agronómica de Montpellier)
- CNRS (Centro Nacional de la Investigación Científica)



❑ BGPI

BGPI tiene una plantilla de 91 científicos y 5 administrativos repartidos en 7 equipos de investigación como

- Equipo 4                    Interacciones arroz (y trigo) - parásitos
- Equipo 5                    Biología evolutiva de hongos fitoparásitos.



Ing. J. Milazzo

Colegas han contribuido a estas presentaciones, que sean agradecidos.

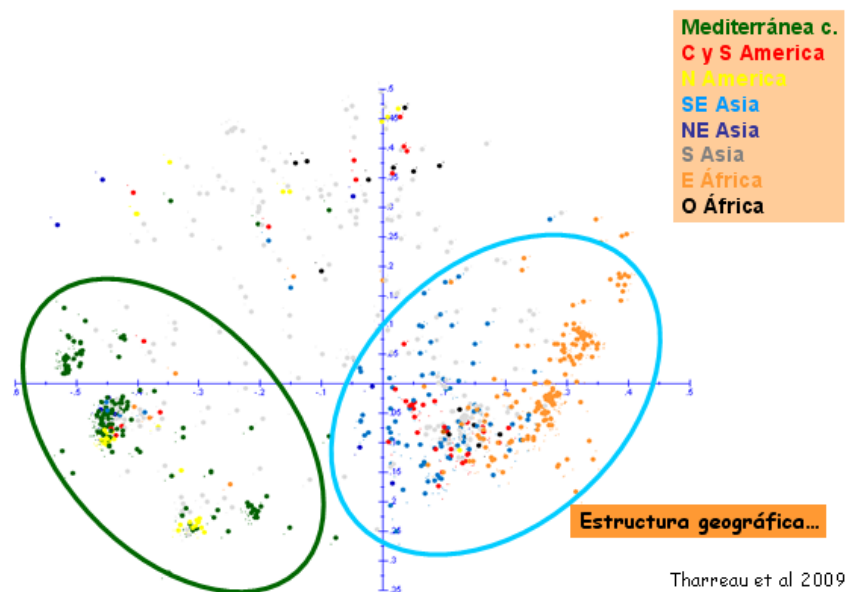
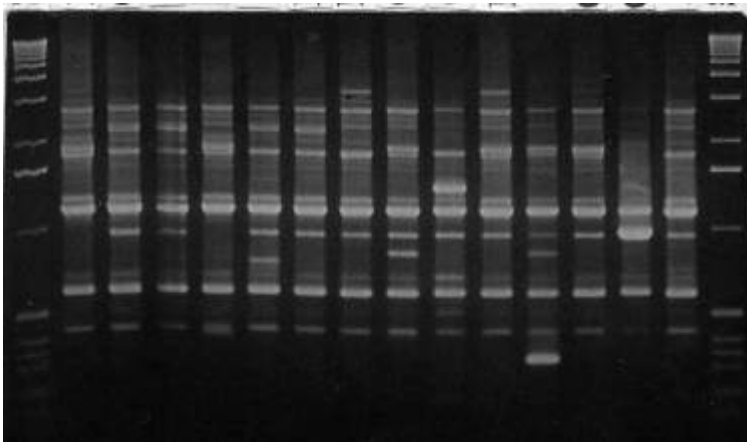


Dr. M. Vales

## ❑ Equipos

- Equipo 4 Interacciones arroz (y trigo) - parásitos
- Equipo 5 Biología evolutiva de hongos fitoparásitos.

Estos equipos obtienen nuevos conocimientos sobre las interacciones planta-parasito, en particular, para la resistencia a la piriculariosis del arroz y del trigo al nivel: molecular, metabólico, individual (variedad y cepas), poblacional (poblaciones locales, nacionales y mundial).

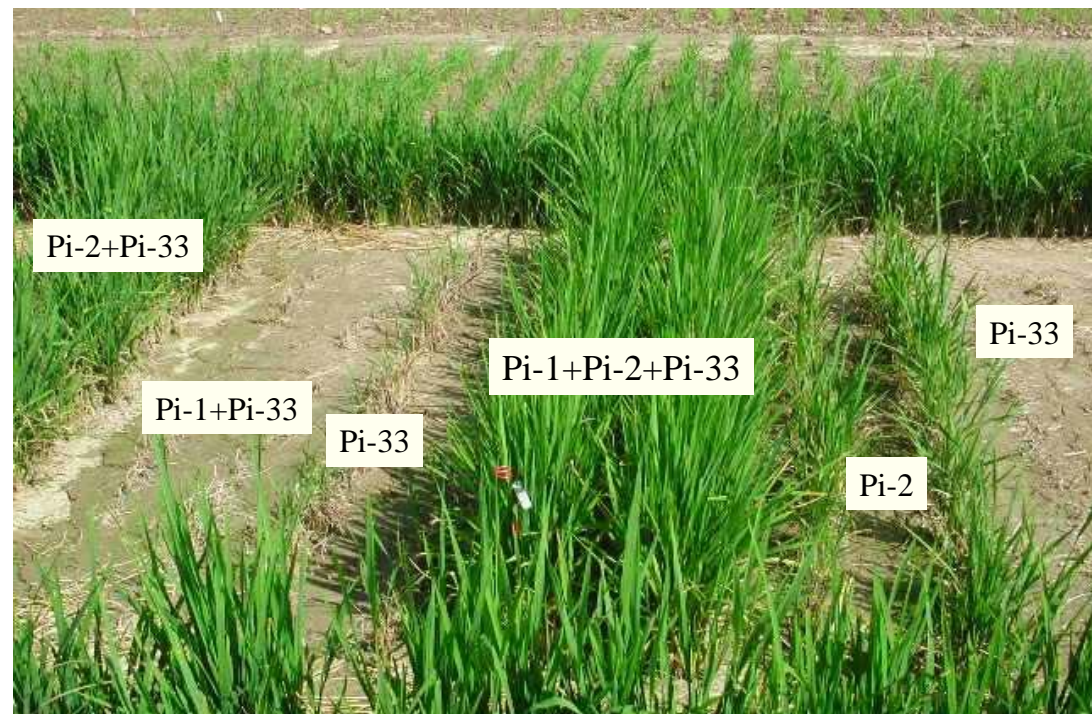




## ❑ Equipos

- Equipo 4 Interacciones arroz (y trigo) - parásitos
- Equipo 5 Biología evolutiva de hongos fitoparásitos.

Es obvio que, de un lado, esta investigación se apoya sobre los métodos de patología de terreno (muestreo, aislamiento, etc.).



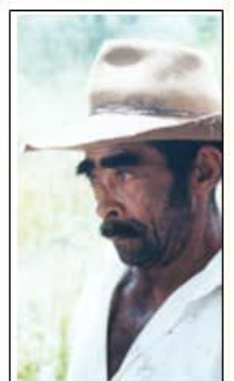


## ❑ Equipos

- Equipo 4                      Interacciones arroz (y trigo) - parásitos
- Equipo 5                      Biología evolutiva de hongos fitoparásitos.

De otro lado, sus resultados pueden ayudar, a mediano o a largo plazo, al mejoramiento genético, en particular, del arroz y del trigo.

En particular, el trabajo del Dr. M. Vales es mejorar los métodos de mejoramiento genético participativo de cultivos alimenticios, entre otros, para la resistencia a enfermedades.

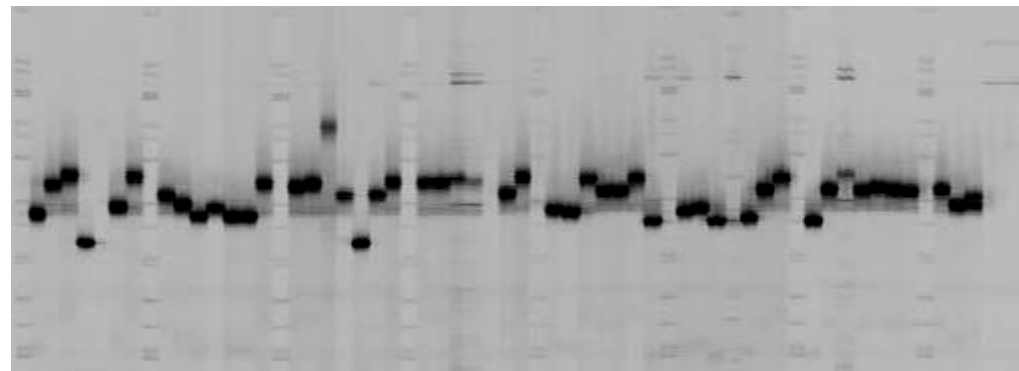


## ❑ Equipos

- Equipo 4 Interacciones arroz (y trigo) - parásitos
- Equipo 5 Biología evolutiva de hongos fitoparásitos.

La Ing. Joëlle Milazzo, bajo la dirección del Dr. Didier Tharreau, tiene la responsabilidad del manejo de la colección mundial de cepas del parásito responsable de la piriculariosis de arroz y trigo.

También, la Ing. J. Milazzo participa a la investigación básica que valoriza esta colección mundial.



!La Ing. J. Milazzo, como sus colegas, es famosa hasta China!

中国农业科学 2003,36(11):1287-1292

Scientia Agricultura Sinica

# 亚洲部分稻瘟病菌的交配型和雌性能育菌株的遗传多样性分析

沈 瑛<sup>1,3</sup>, J.L.NOTTEGHEM<sup>2</sup>, J.MILAZZO<sup>3</sup>, 袁筱萍<sup>1</sup>, 邓一文<sup>1</sup>,  
H.ADREIT<sup>3</sup>, 王艳丽<sup>1</sup>, D.THARREAU<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国水稻研究所, 杭州 310006; <sup>2</sup> 法国生物和植物病理大学, 蒙贝利埃 34060;

<sup>3</sup> 法国国际农艺研究和发展中心, 蒙贝利埃 34398)

**摘要:** 用稻瘟病菌两性菌株测定中国及亚洲部分国家稻瘟病菌有性时期的交配型和雌性能育菌株, 并用 SCAR 分子标记对 143 个菌株进行 PCR 扩增, 分析它们的遗传多样性, 得到亲缘关系树状图。

**关键词:** 稻瘟病菌; 两性菌株; 交配型; SCAR; 有性生殖; 遗传多样性

S511 A

## Analysis of Genetic Diversity of Mating Type and Female Fertility Isolates of *Magnaporthe grisea* Populations in Some Asian Countries

SHEN Ying<sup>1,3</sup>, J.L.NOTTEGHEM<sup>2</sup>, J.MILAZZO<sup>3</sup>, YUAN Xiao-ping<sup>1</sup>, DENG Yi-wen<sup>1</sup>,  
H.ADREIT<sup>3</sup>, WANG Yan-li<sup>1</sup>, D.THARREAU<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;



UMR - BGPI  
Biologie et Génétique  
des Interactions Plante-Parasite

## 2. Convenio de Colaboración Científica CIAT-CIRAD

La base de la colaboración son temas de interés compartidos.

El mandato del CIRAD es:

- ❑ Investigación básica para la obtención de nuevos conocimientos (interés sobre todo del CIRAD)
- ❑ Reforzamiento de las capacidades de socios bolivianos.





- ❑ Reforzar las capacidades de socios bolivianos:
  - Formación por la aplicación, en ocurrencia, en Estrategia de Mejoramiento Genético Participativo del Arroz de Secano (EMPAS) (interés sobre todo del CIAT)
  - Formación por seminarios y cursos (financiamiento CIRAD y IRD-Bolivia)



**CIRAD e IRD Francia dictan curso sobre Sistemas de Informacion Geografica en el CIAT**



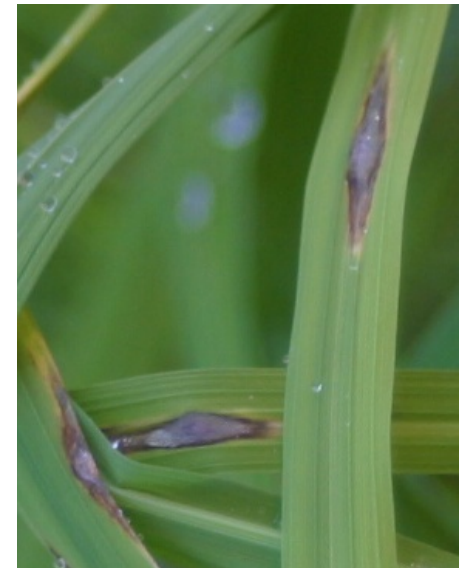
- ❑ Formación por seminarios y cursos (financiamiento CIRAD y IRD)
  - Dr. M. Vales (CIRAD BGPI) EMPAS
  - Dr. D. Tharreau (CIRAD UMR BGPI) *Magnaporthe* ssp
  - Dr. S. Bouzinac (CIRAD UPR SIA) SCV en seco
  - Ing. M.Sc. J. Dossmann (Aceituno Dpto. Investigación) *Burkholderia glumae*
  - Ing. Iva Urrego (Aceituno Dpto. Producción) SCV en inundado
  - Ing. M.Sc. J. Dossmann (Aceituno Dpto. Investigación) EMPA Inundado
  - P. Gin (AgroParisTec) SIG
  - Ing. J. Milazzo (CIRAD UMR BGPI) Fitopatología.

### 3. Piriculariosis del arroz y del trigo

#### ❑ Piriculariosis del arroz

Se elija este ejemplo para este curso porque el arroz es el alimento de más de la mitad de la humanidad y tiene una importancia grande en la canasta familiar boliviana,

y porque la piriculariosis es su enfermedad la más grave. Arroz y *Magnaporthe grisea* (parasito de la piriculariosis) sirven de modelo mundial de estudio.



## ❑ Piriculariosis del trigo

Se elija este ejemplo para este curso porque el trigo es el cereal de mayor producción en el mundo y su área de cultivo esta creciendo rápidamente en Bolivia,

y porque la piriculariosis es una enfermedad nueva muy grave de esta especie (únicamente en Brasil, en Bolivia y poco en Argentina).

La evaluación mundial de la resistencia a la piriculariosis del trigo se realiza en el municipio de Quirusilla, cantón de Quirusilla, provincia de Florida, departamento de Santa Cruz, Bolivia.



© E. Guzman



## 4. Objetivo del curso/demostraciones

El objetivo es capacitar sobre los aspectos más prácticos y aplicados de los métodos de fitopatología que se necesitan para el mejoramiento genético de la resistencia a la piriculariosis del arroz y del trigo.

















Se entrega la información tres veces:

☐ **C**urso (PowerPoint)














Por el Dr. M. Vales

## ❑ Entregas de 16 **P**rotocolos (volantes)

-  P1-Introduccion-22 03 12.doc
-  P2-Muestreo-22 03 12.doc
-  P3-Obtencion aislamientos multiesporicos-22 03 12.doc
-  P4-Obtencion cepas monoesporigas con control visual-22 03 12.doc
-  P5-Obtencion cepas monoesporigas sin control visual-22 03 12.doc
-  P6-Multiplicacion cepas-22 03 12.doc
-  P7-Conservacion cepas-22 03 12.doc
-  P8-Preparacion inoculo para bandejas-22 03 12.doc
-  P9-Inoculacion bandejas-22 03 12.doc
-  P10-Lectura e interpretacion de sintomas en bandejas-23 03 12.doc
-  P11-Mejoramiento genetico participativo-23 03 12.ppt
-  P12-Ajuste poblacion recurrente-23 03 12.doc
-  P13-Obtencion inoculo para campo-23 03 12.doc
-  P14-Inoculacion esparcidores-23 03 12.doc
-  P15-Interpretacion sintomas campo-23 12 03.doc
-  P16-Trucos economicos-23 03 12.doc



❑ Entregas de 11 **A**nexos

-  A1-Resistencia completa R parcial-23 03 12.doc
-  A2-Postulados de Koch-23 03 12.doc
-  A3-Medios cajas Petri-24 03 12.doc
-  A4-Aislamiento cepa raza-23 03 12.doc
-  A5-Caja de guantes-23 03 12.ppt
-  A6-Conteo esporas-23 03 12.ppt
-  A7-Escalas 1-2-3 piri foliar-23 03 12.pptx
-  A8-Selección recurrente-23 03 12.doc
-  A9-Escala 4 piri foliar-23 03 12.ppt
-  A10-Escala 5 piri espiga-24 03 12.ppt
-  A11-AUDPC-23 03 12.ppt

# ❑ Demostración de estos métodos (laboratorio, casa de malla)



por la Ing. J. Milazzo.



La demostración de estos métodos será en la Estación Experimental Agrícola de Saavedra, por lo tanto se necesita viajar con un micro a partir del CIAT Santa Cruz de la Sierra



# Muestreo de la piriculariosis

## 1. Introducción

### □ Gramíneas (*Poaceas*)

Es muy probable que la piriculariosis (*Magnaporthe* sp.) ataca todas las gramíneas (digitalaría, setaria, eleusine, alpiste, etc.).

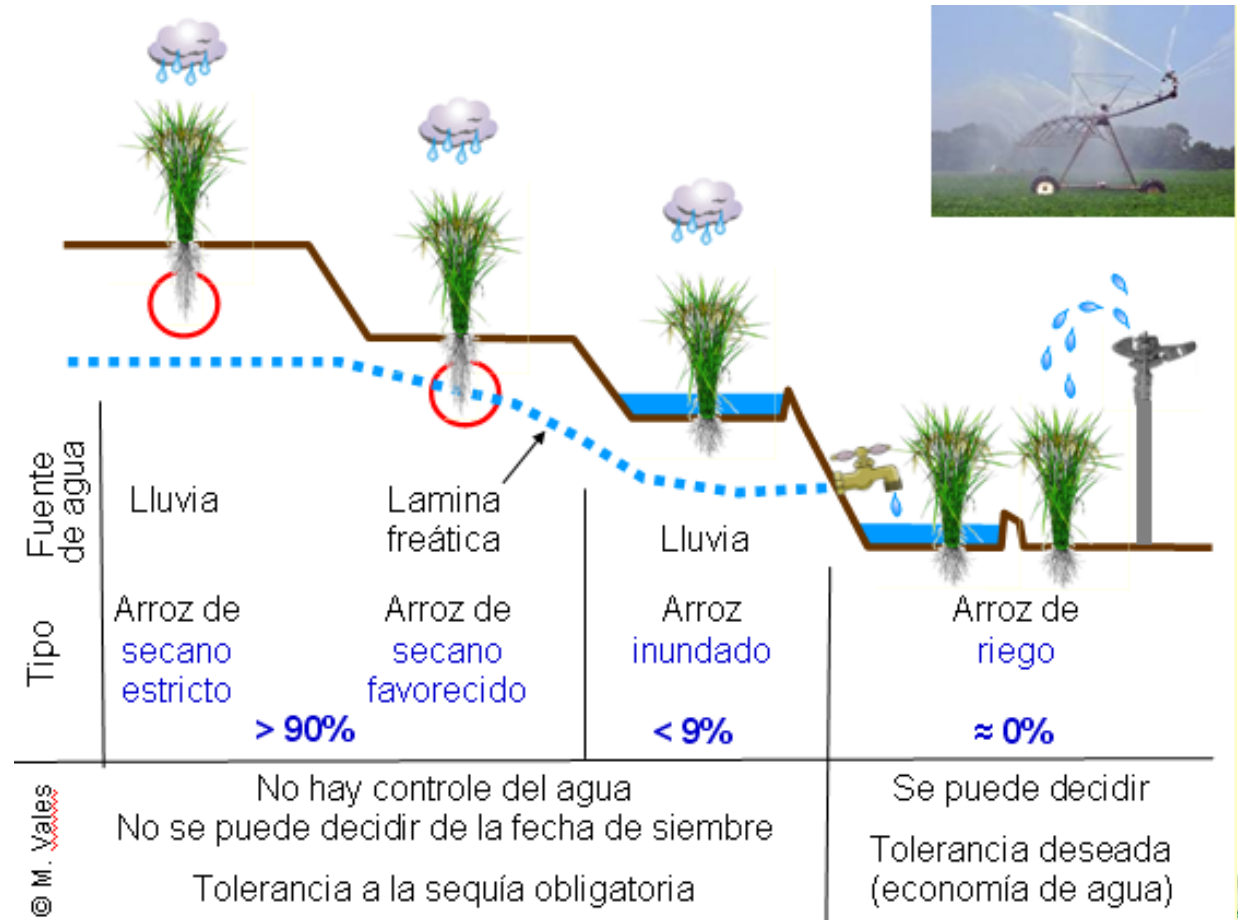
Cuando no es reportado, es probable porque la enfermedad nunca ha sido estudiada sobre la especie considerada, porque no es un problema del cultivo o porque el huésped es una maleza. La piriculariosis de una especie huésped en general no ataca otra especie huésped.





## ❑ Arroz

Las variedades de arroz de riego son más susceptibles que la variedades de secano, pero la condiciones de cultivo de secano (>90% en Bolivia) son más favorables a la enfermedad que las condiciones de riego (<1% en Bolivia).





La piriculariosis ataca todas las partes aéreas del arroz: hoja, tallo, vaina de la panoja, cuello de la panoja, panoja y grano.



## ❑ Trigo

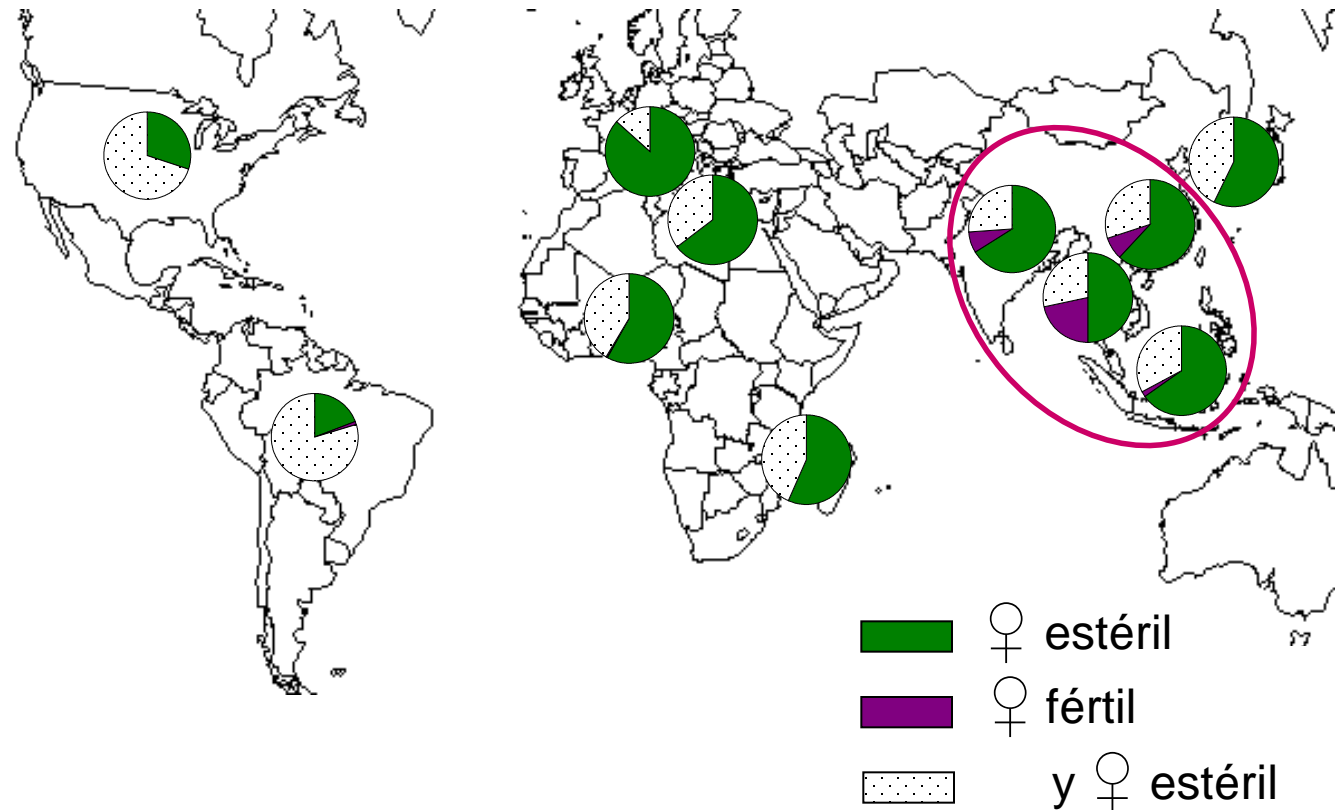
No hay variedades conocidas de trigo con resistencia completa (sin síntomas).

Únicamente las espigas son afectadas por la piriculariosis en condiciones de cultivo.



## 2. Protocolo

- Si se trata de una prospección para contribuir al estudio local o nacional (por lo tanto útil a un estudio regional y/o mundial) de la variabilidad de la población de *Magnaporthe* ssp., el encargado de dicho estudio entregara recomendaciones para sistematizar el muestreo.



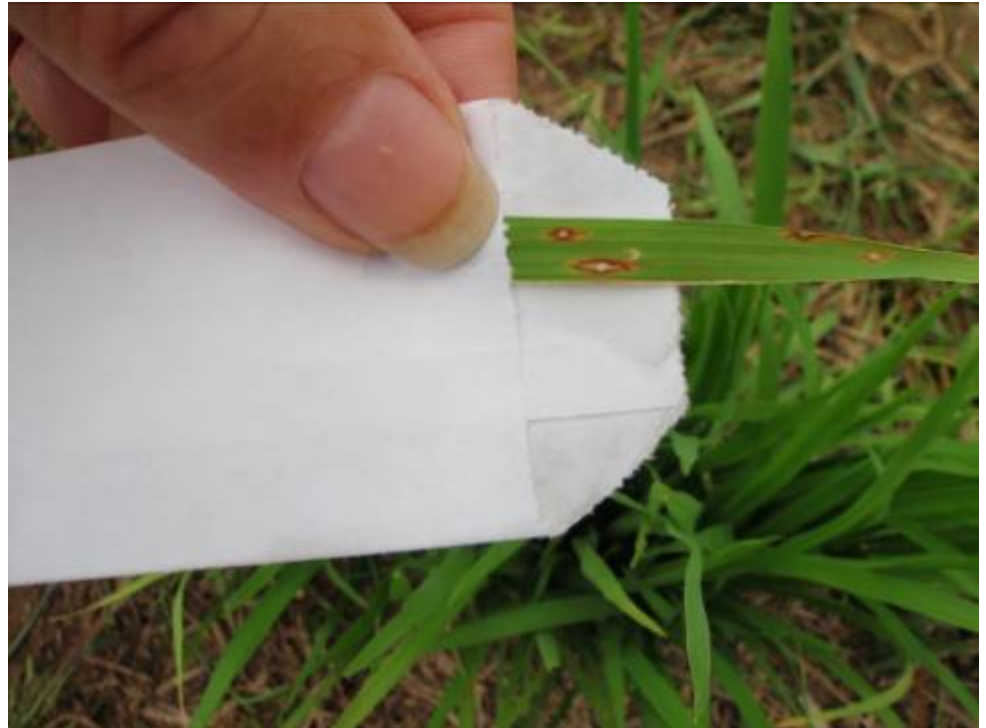


- ❑ No cosechar órganos (hojas, espigas, etc.) demasiados afectados por el parásito porque en los tejidos muertos se desarrollan saprofitos (hongos, etc. que crecen únicamente en tejidos muertos) lo que va a complicar el aislamiento en laboratorio del parásito buscado.
- ❑ Cosechar órganos que tienen lesiones (manchas) bien aisladas, es decir con tejido sano (verde) a su alrededor.





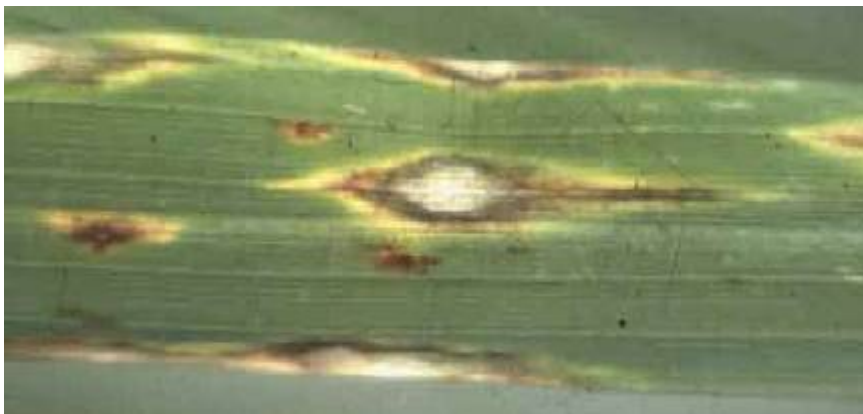
- ❑ Poner cada muestra es un sobre de papel sobre el cual se ha escrito:
- La información para geo-localizar precisamente el lugar del muestreo: nombres del campo, del productor, del lugar, del pueblo cercano, de la provincia, del departamento, del país, o, mucho más sencillamente, las coordenadas GPS (longitud, latitud, altitud).



- Las fechas del muestreo y de la siembra del cultivo y/o indicar el estado (germinación, nacimiento, macollamiento, embuchamiento, floración, maduración, .... semillas de granero, etc.).



- El nombre de la especie. Si hay duda, tomar foto de plantas y de flores y/o tomar unas plantas enteras como muestra, para una identificación posterior, y semillas si hay.
- El nombre de la variedad, cuando se trata de un cultivo. Cuidado con los nombres vernáculos, descriptivos - como “noventón”, “grano de oro”, etc. que pueden corresponder, cada uno, a varias variedades - o en un idioma nativo
- Indicar el nombre del órgano: hoja, tallo, cuello, panoja o espiga, grano, raíz (por otros parásitos), etc.





- El nombre de la enfermedad. Si hay duda tomar fotos en macro de las lesiones y más muestras, y contactar un especialista para el diagnostico (Servicio de la Unidad MIC (Manejo Integrado de los Cultivos) del CIAT, Postas de Clínica de las Plantas del CIAT, etc.).





- ❑ Quedar vigilante. Aunque se busca piriculariosis, no dudar documentar (fotos, muestras, etc.) cualquier problema fitosanitario, de cualquier cultivo, grave y/o desconocido. Informar lo más ante posible un servicio oficial adecuado (CIAT-MIC, SENASAG, INIAF, etc.)
- ❑ Se debe utilizar las muestras lo más ante posible.

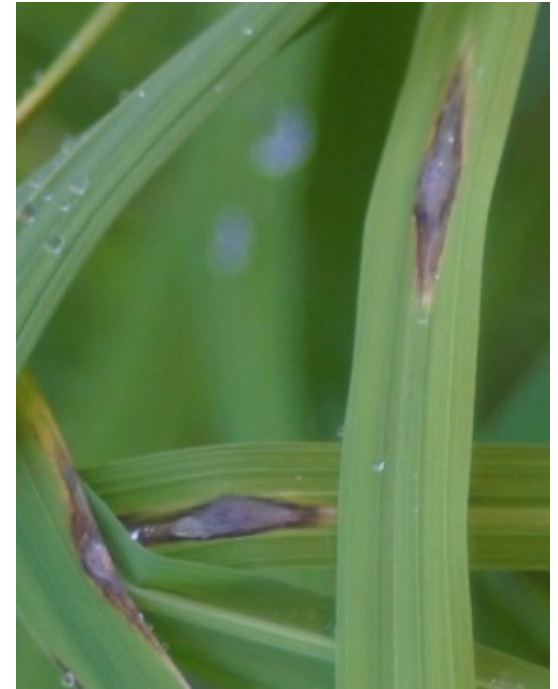


# Aislamiento multiesporico, cepa monoesporica y raza

## 1. Aislamiento multiesporico

Un aislamiento se obtiene a partir de una lesión (mancha debido a la enfermedad).

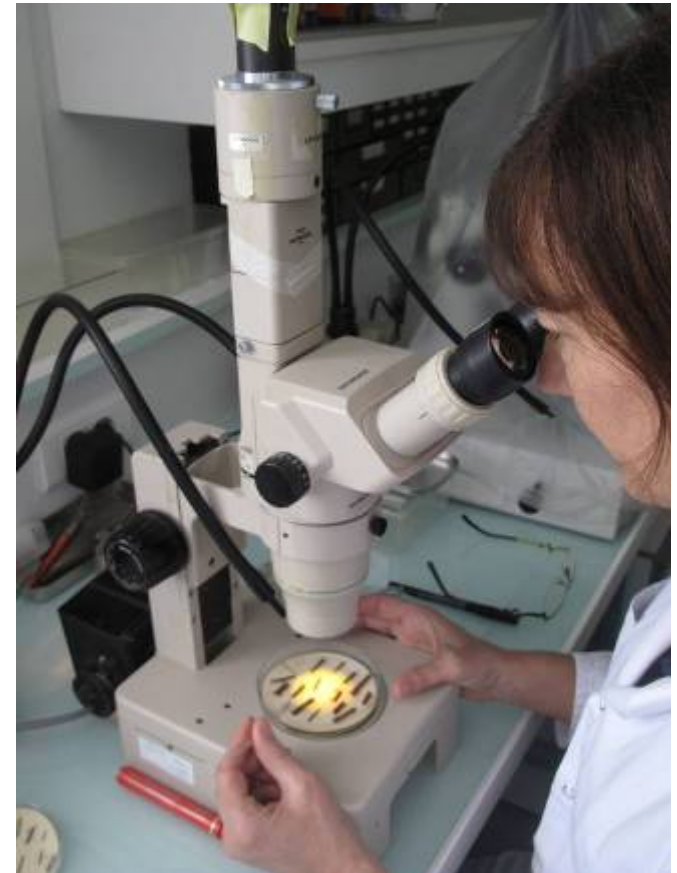
Como dicha lesión puede resultar de la infección por varias esporas (forma de dispersión) de un hongo parásito que provoca la enfermedad, un aislamiento es supuestamente multiesporico, por lo tanto considerado como genéticamente heterogéneo.



## 2. Ceba monoesporica

A partir directamente de una lesión o a partir de un aislamiento se puede individualizar esporas para obtener el mismo numero de cepas entonces monoesporicas.

Una cepa es, en microbiología, un conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

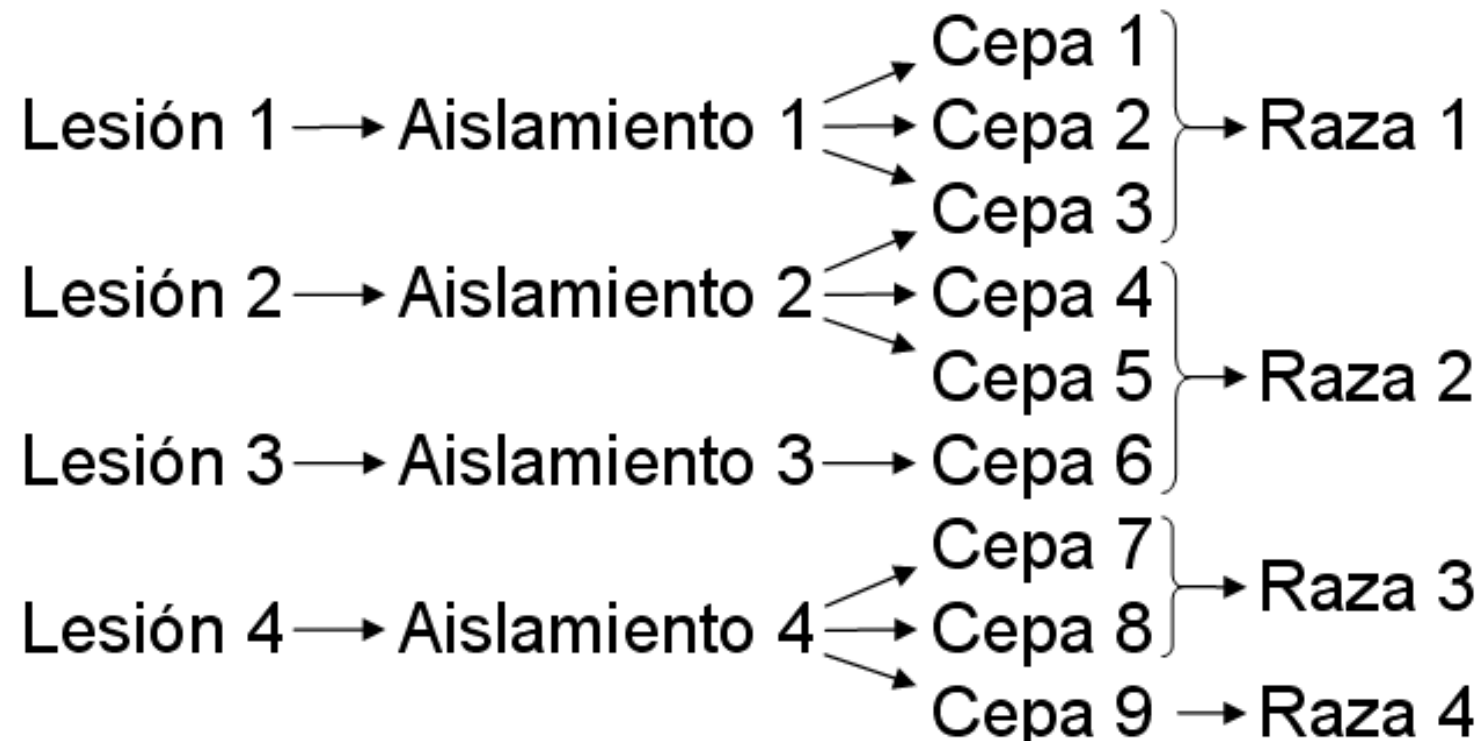


### 3. Raza

Una raza es una cepa o un conjunto de cepas de misma(s) característica(s).

Por lo tanto las razas son el resultado de caracterización(es) que sea(n) patogénica, fisiológica, genética, etc.

Por lo tanto, en resumen, los casos siguientes son posibles:

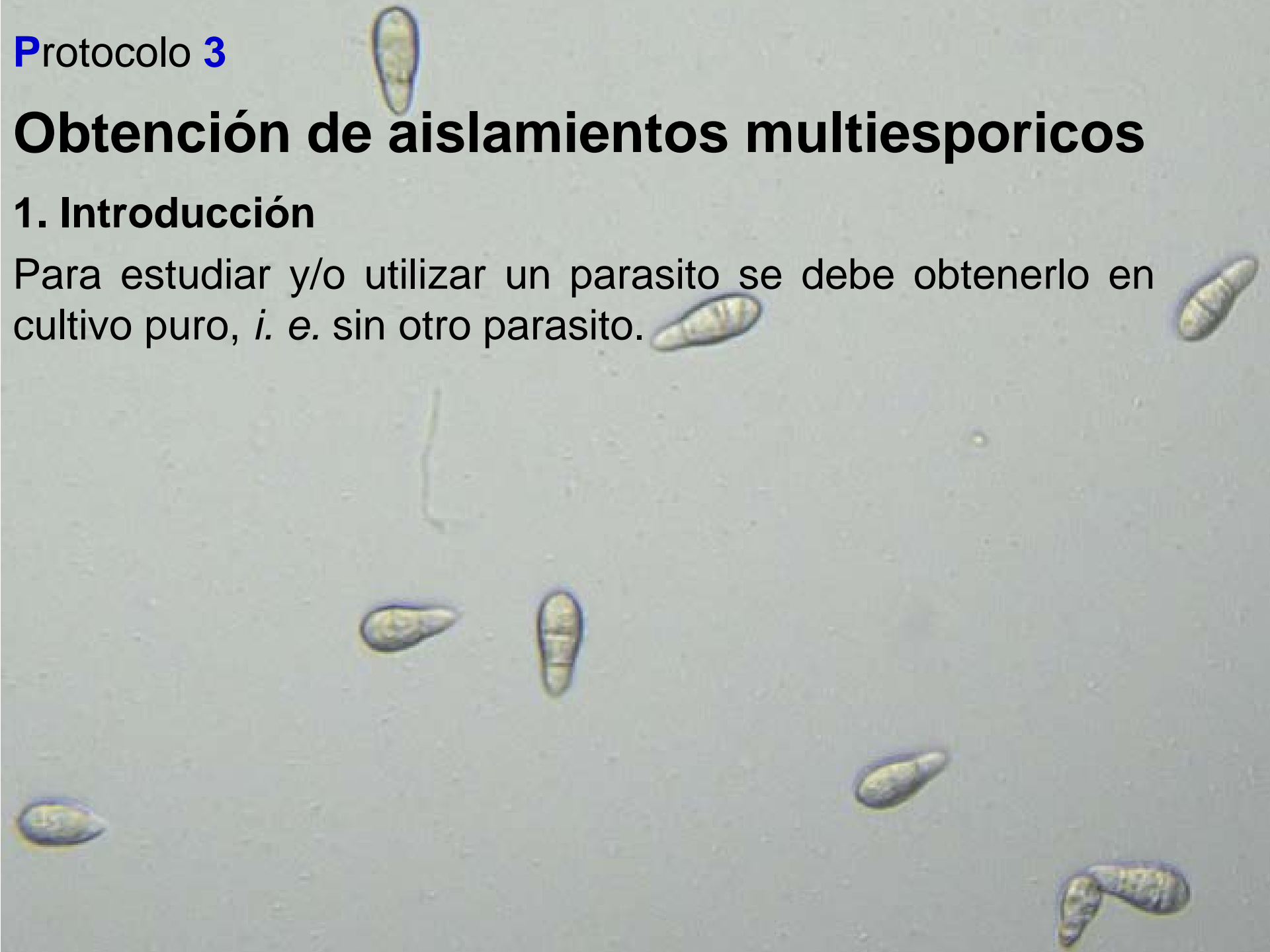




# Obtención de aislamientos multiesporicos

## 1. Introducción

Para estudiar y/o utilizar un parasito se debe obtenerlo en cultivo puro, *i. e.* sin otro parasito.



## 2. Protocolo

Se ponen las muestras infectadas (hojas, semillas, cuellos) en cajas de Petri sobre un papel filtro húmedo.

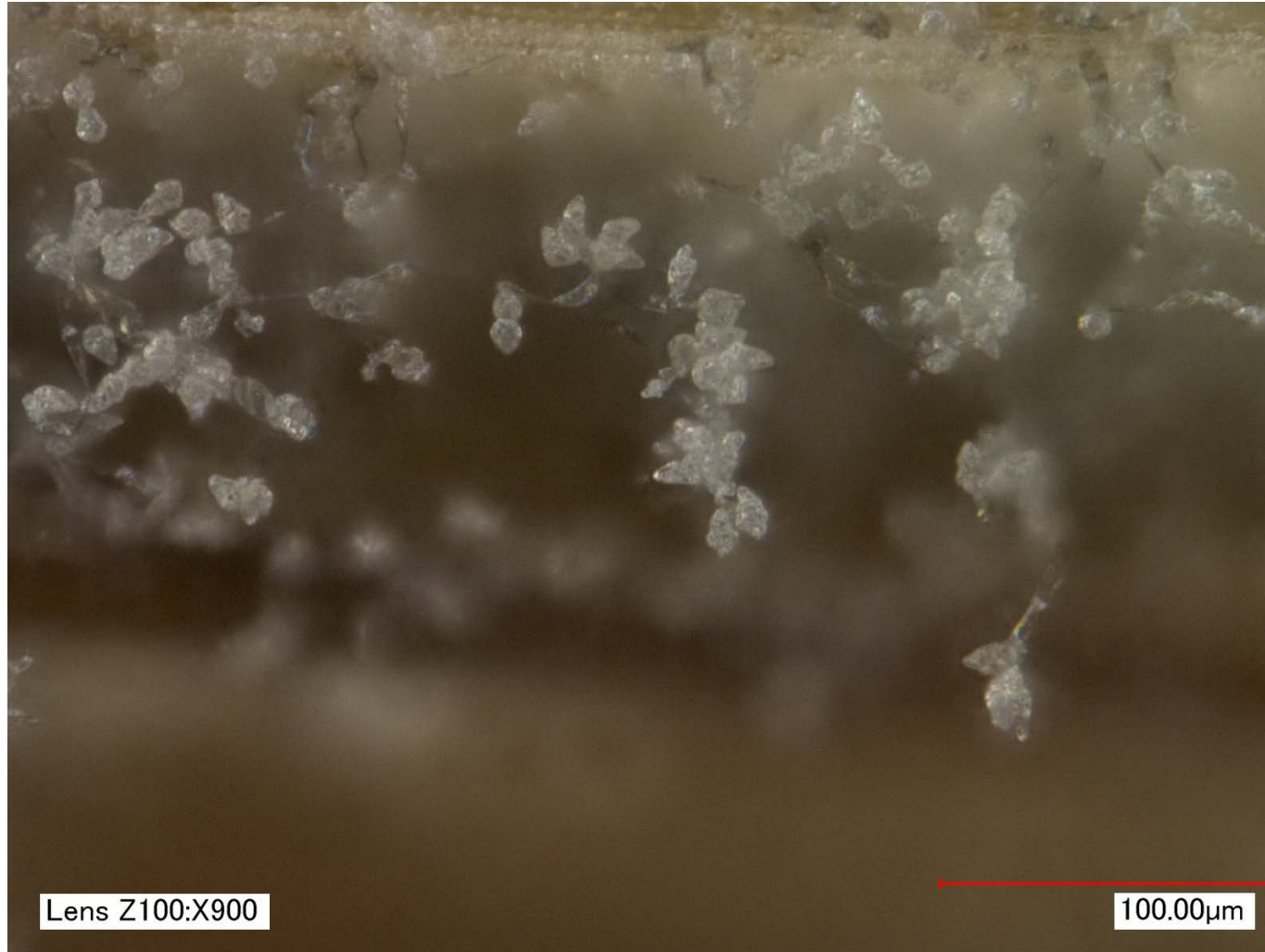
Se guarda las cajas en las condiciones de laboratorio.



Un días después, el hongo debe fructificar (aparición de esporas), el centro de las lesiones debe aparecer en gris.

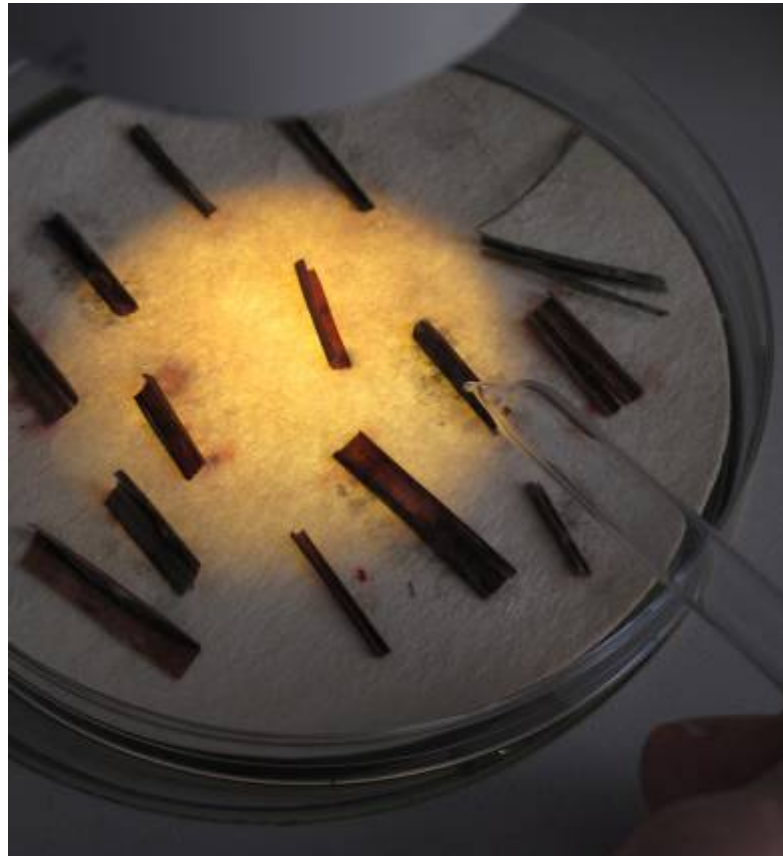


Con lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación de 120-200) se puede averiguar la presencia de fructificación.





En condiciones estériles, abrir la caja de Petri y recoger algunas esporas rozando una lesión con la punta redonda (obtenida a poner dicha punta en una llama) de una pipeta Pasteur.

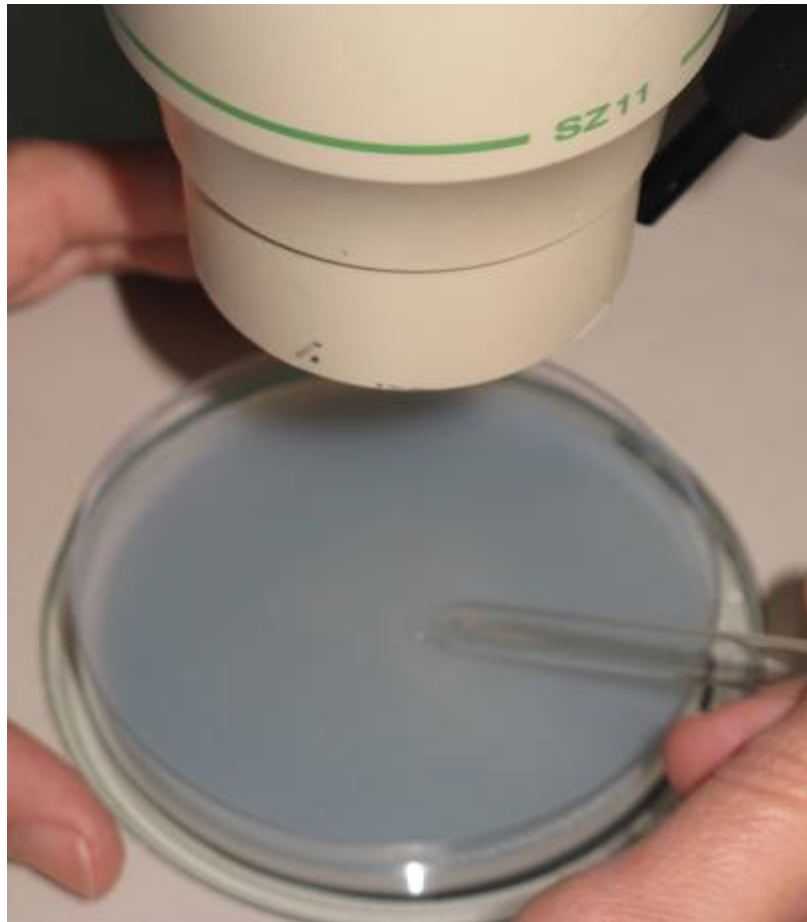


Después, con la pipeta Pasteur tocar en varias zonas, la superficie del medio de cultivo harina de arroz de una caja de Petri.

Cerrar la caja de Petri con cinta adhesiva, por ejemplo Tesa Scotch®, y ponerla a 25 °C y luz blanca 12 h/24 h, durante 7 días.



Una semana después, en cada zona tocada por la punta de la pipeta Pasteur, se ve el desarrollo del aislamiento multiesporico.



### 3. Paso siguiente

Después se puede obtener cepas monoesporicas con control visual o sin control visual.

También, se puede multiplicar los aislamientos multiesporicos de las misma forma que las cepas monoesporicas.

En fin, si hay una duda inicial con respecto a la atribución de los síntomas de la muestra a *Magnaporthe* ssp, se debe aplicar los postulados de Koch.





# Postulados de Koch

## 1.Objetivo

Los postulados de Koch fueron formulados en 1881 por Robert Koch, a partir de sus experimentos con el *Mycobacterium tuberculosis*, pero han sido generalizados para el resto de las enfermedades infecciosas, con objetivo de saber cuál es el agente participante.



Robert KOCH 1843-1910  
Médico alemán  
Premio Nobel en 1905

## 2. Postulados

Para asegurarse que un agente patógeno es el responsable de una enfermedad se debe cumplir con todos los postulados siguientes:

1) El agente patógeno debe estar presente en todas las plantas que tienen los síntomas de la enfermedad y ausente en las plantas sanas.



2) El agente debe ser aislado, a partir de las lesiones de la enfermedad, y cultivado de forma pura.



3) El agente debe provocar los mismos síntomas de la enfermedad, al ser inoculado en una planta susceptible



4) El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en dicha planta susceptible.



# Obtención de cepas monoesporicas con control visual

## 1.Introducción

Se puede obtener cepas monoesporicas

a partir del cultivo de aislamientos multiesporicos o

a partir directamente de unas muestras infectadas (hojas, semillas, cuellos).



## 2. Preparativos

☐ O se tiene un cultivo de aislamiento multiesporico de por lo menos 4 días

☐ O un día antes de obtener cepas monesporicas poner las muestras infectadas (hojas, semillas, cuellos) en cajas de Petri sobre papel filtro húmedo, para obtener fructificación (aparición de esporas) del hongo a la superficie de las lesiones.



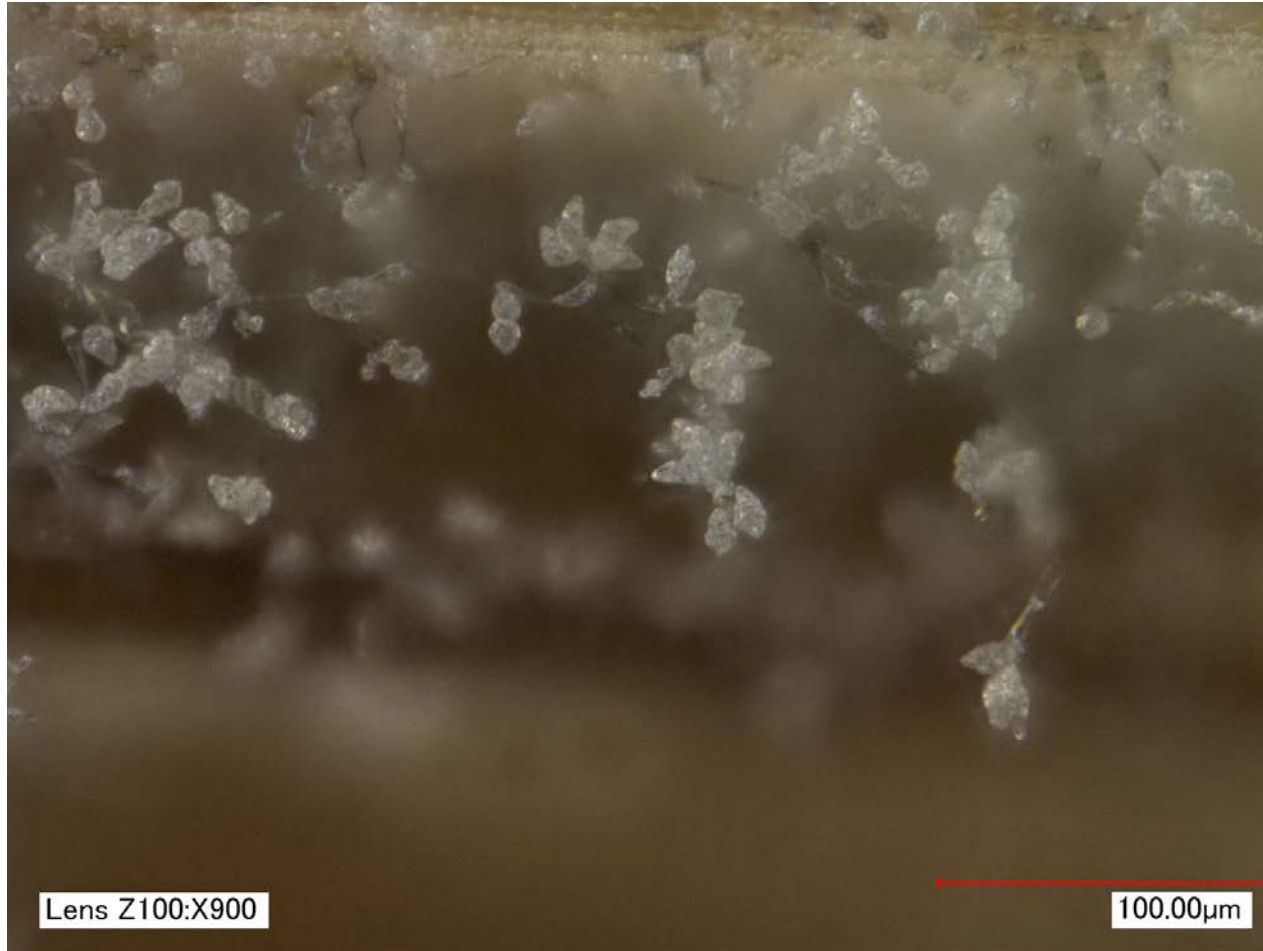


❑ En ambos casos, preparar cajas de Petri con medio bacto-agar a 4,5 g / 100 ml para individualizar esporas y cajas de Petri con medio de cultivo harina de arroz para el crecimiento del hongo.



### 3. Obtención de esporas separadas

La presencia de esporas se controla visualmente con una lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación 120).



Recoger algunas esporas rozando las lesiones o el cultivo del hongo con la punta redonda (obtenida a poner dicha punta en una llama) de una pipeta Pasteur y tocar, con ella, en varias zonas, rozando la superficie del medio bacto-agar a 4,5 % de una caja de Petri.

La presencia de esporas, sobre el medio, se controla visualmente con una lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación 120).



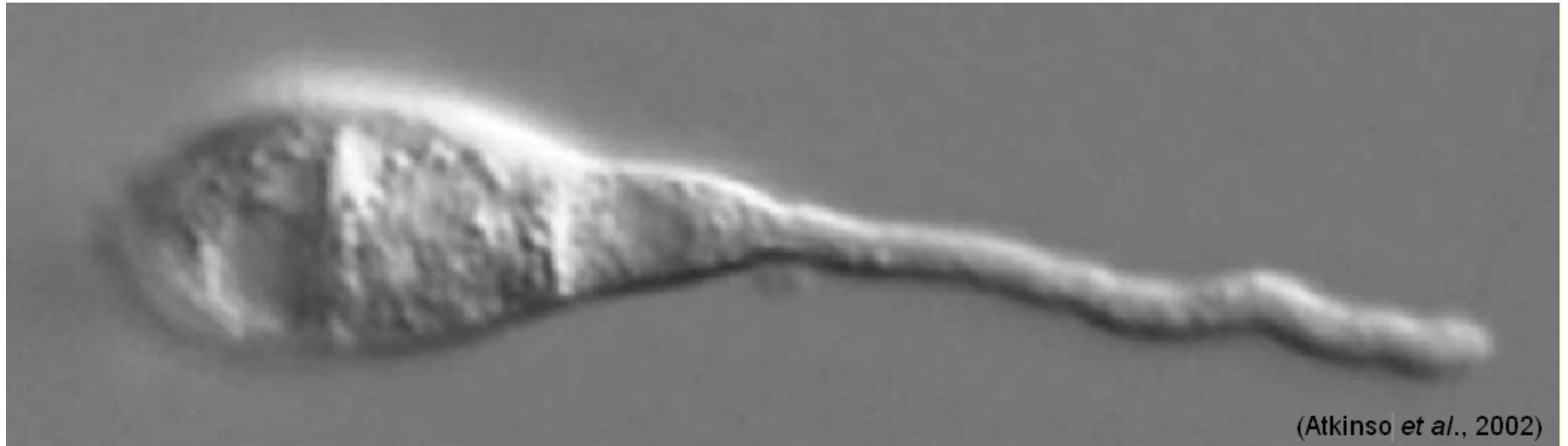
Con control visual, utilizando una lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación 60), se separar las esporas de modo que los futuros filamentos, debido a la germinación, no se toquen.





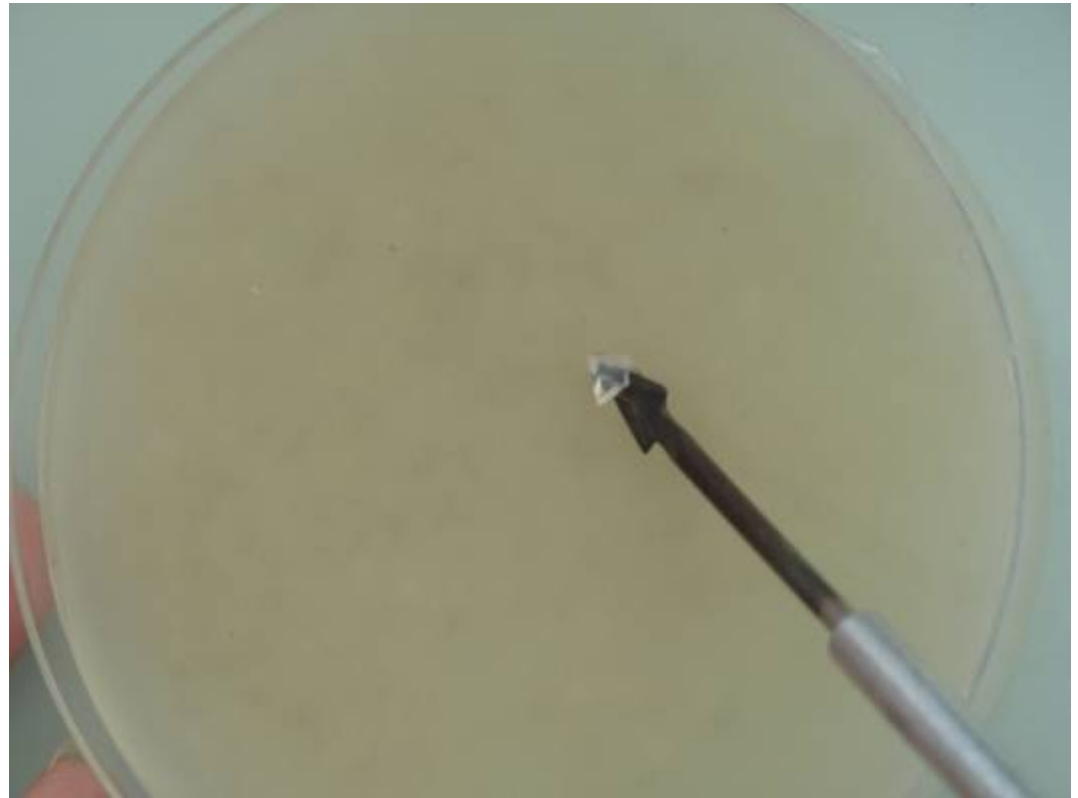
## 4. Transferencia de esporas sobre medio de cultivo harina de arroz

El día siguiente, controlar visualmente si hay germinación de las esporas con una lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación 120)



Con una lupa binocular (ocular x objetivo  $\approx$  ampliación 60), recuperar cada espora germinada individualmente, cortando el medio bacto-agar todo alrededor de dicha espora, con un bisturí o una aguja lanceolada, recogerla y transferirla sobre el medio harina de arroz de otra caja de Petri.

Cerrar la caja de Petri con cinta adhesiva, por ejemplo Tesa Scotch®, y ponerla en la cámara de crecimiento a 25 °C y luz blanca 12 h/24 h, durante 7 días.

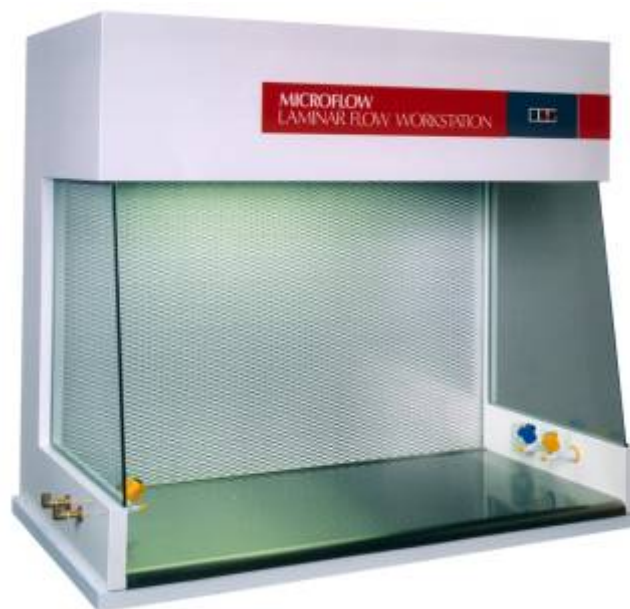


# Obtención de cepas monoesporicas sin control visual

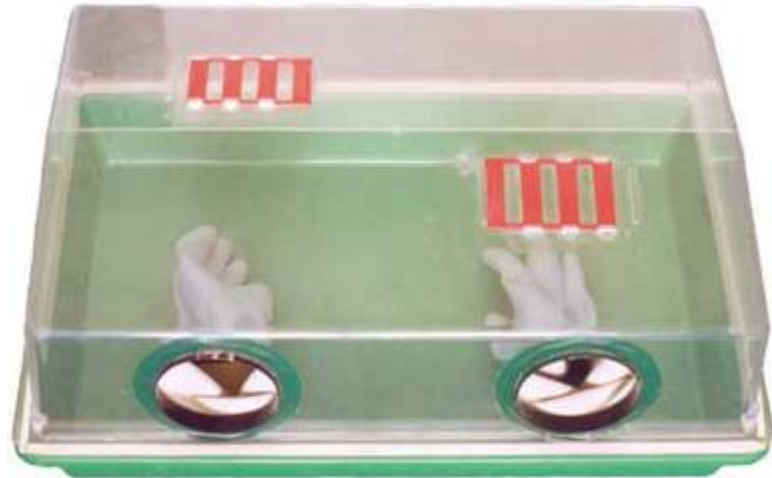
## 1. Introducción

El control visual para la obtención de cepas monoesporicas no es posible cuando:

- ☐ Se tiene una camera de flujo laminar pero no lupa binocular



❑ Se tiene una caja de guantes (o caja seca) pero no una lupa binocular con videocámara digital (de conexión USB), que puede entrar en dicha caja de guantes, y una computadora.





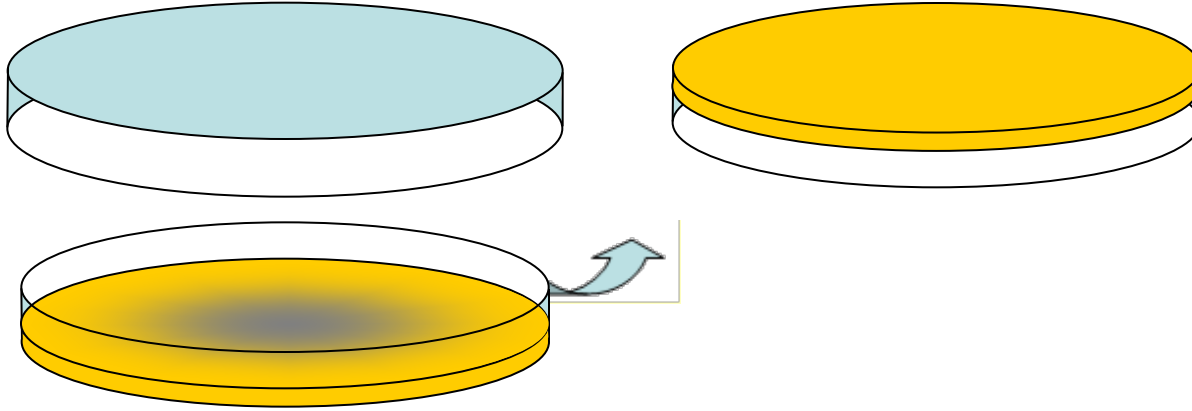
### 3. Protocolo

En este caso, se puede, sin embargo, realizar este trabajo sin control visual, con esta propuesta de un método inspirado del método utilizado para purificar cepas bacterianas.

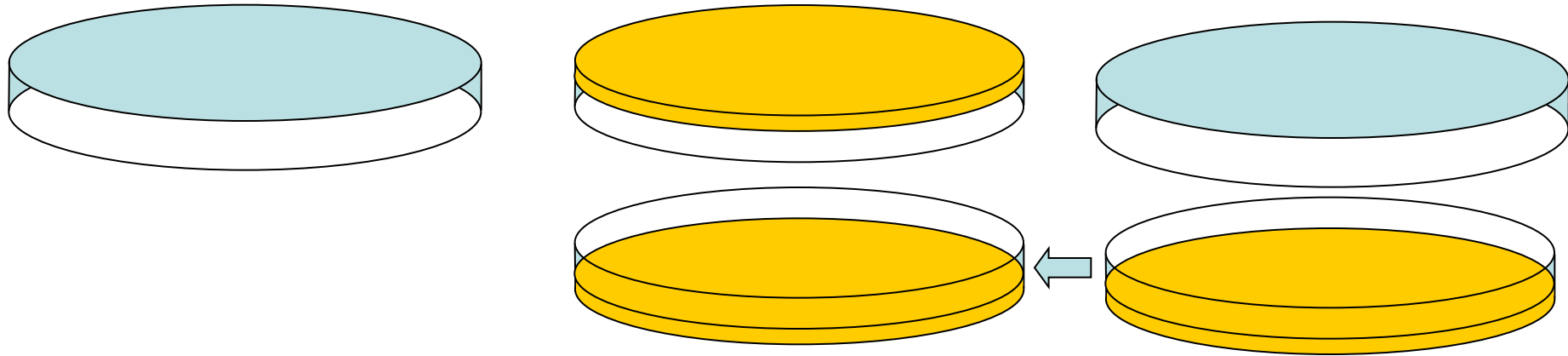


En la caja seca, previamente estilizada con alcohol, se introduce los materiales necesarios que se desinfectan superficialmente con un algodón mojado con alcohol.

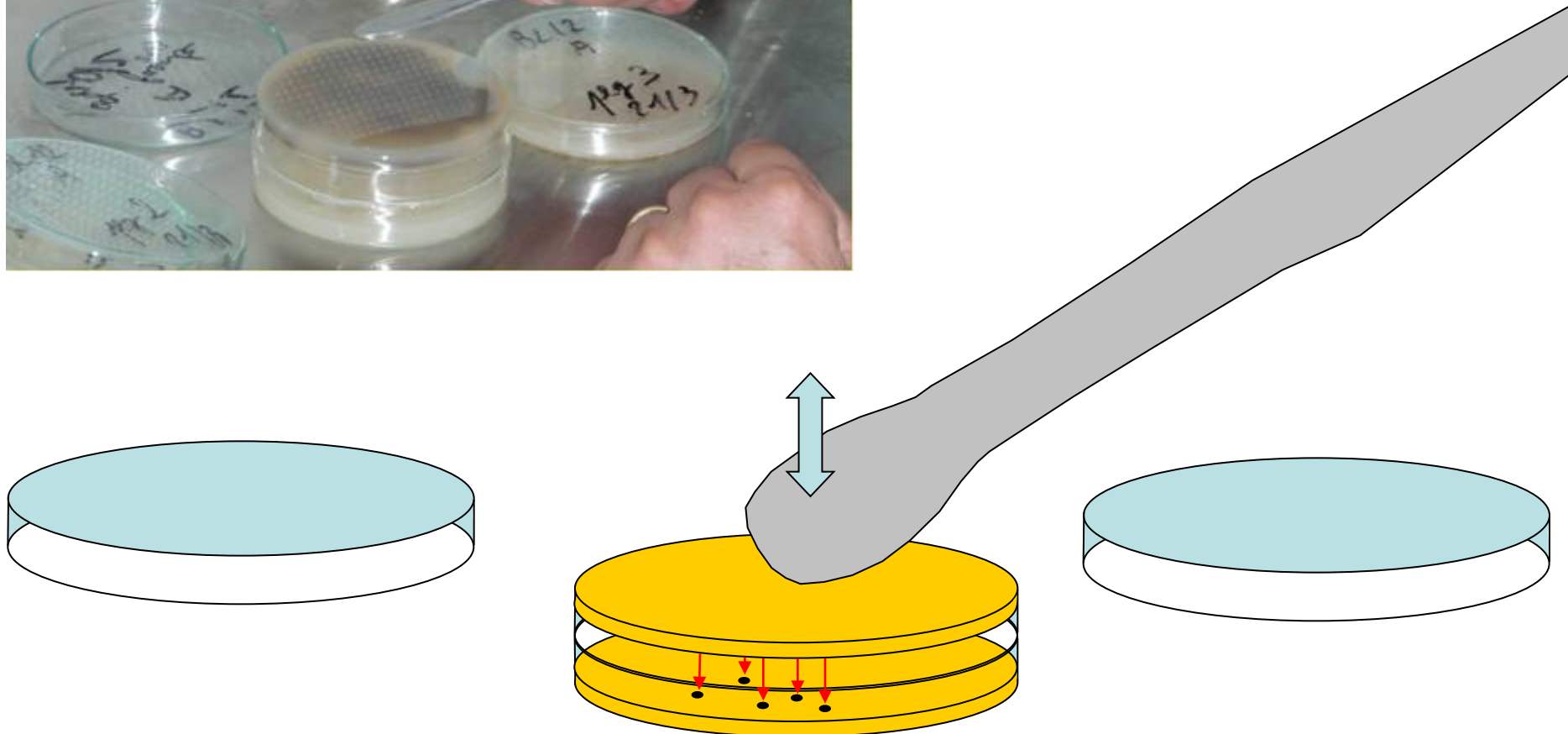
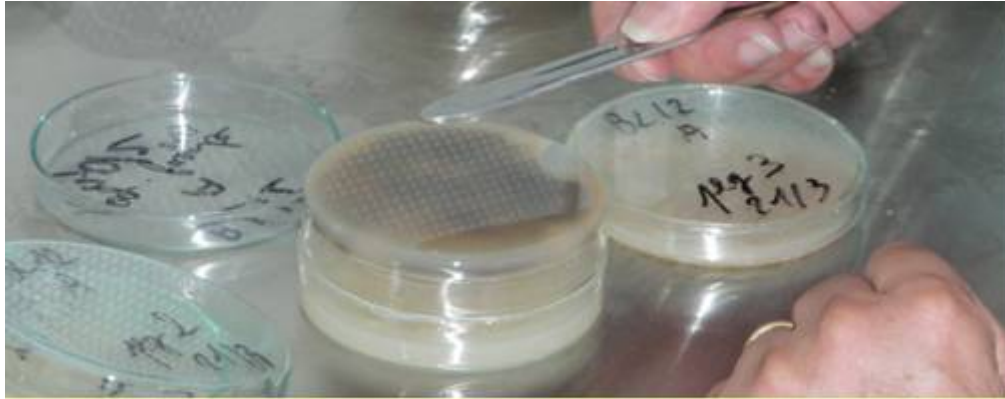
❑ Destapar y poner al revés una caja con el cultivo (aislamiento, supuestamente multiesporico)



❑ Destapar una caja de Petri con medio harina de arroz virgen y ponerla debajo de la caja precedente

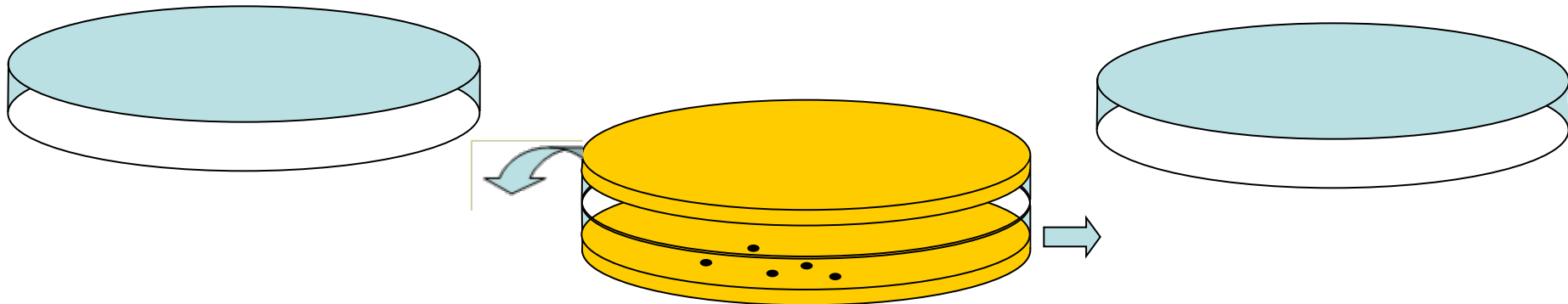


- ❑ Pegar ligeramente, con una espátula o una cucharita, la caja de arriba
- ❑ Esporas caen del aislamiento sobre el medio de cultivo virgen

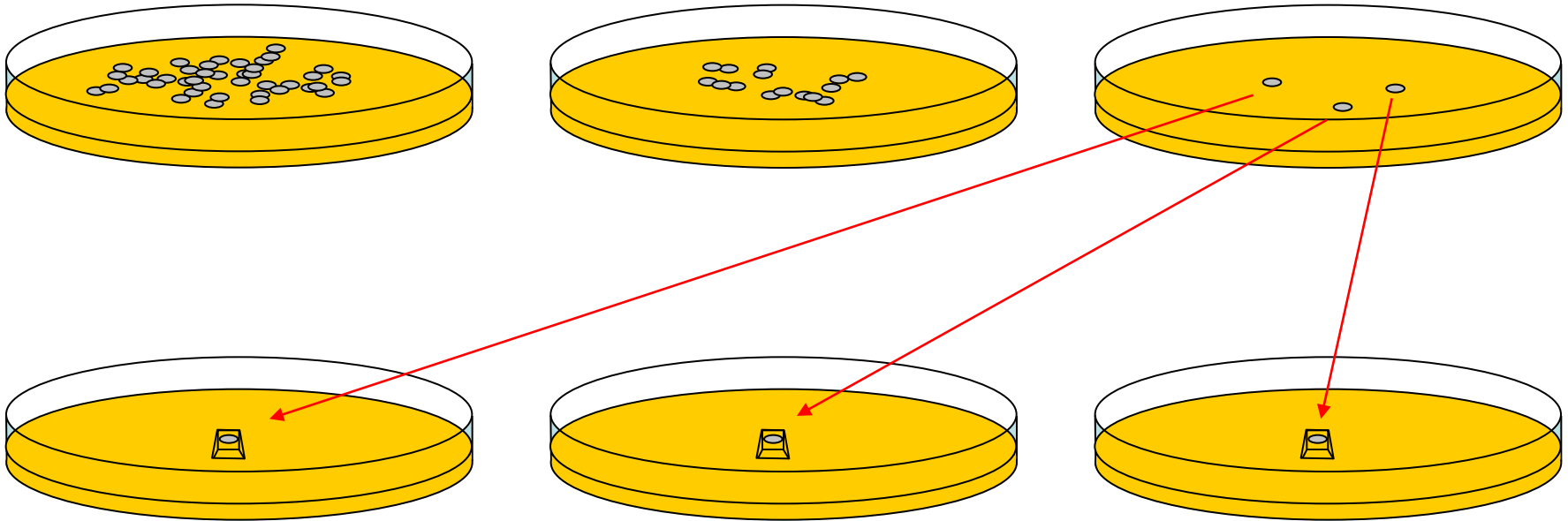




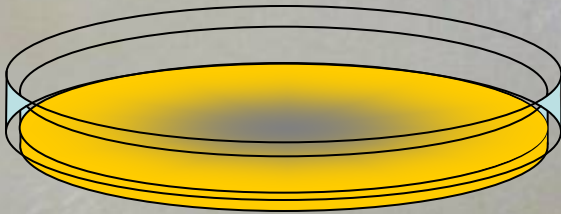
- ❑ Tapar las dos cajas de Petri
- ❑ Repetir, 2 o más veces, el mismo proceso cambiando no más que la caja con el medio de cultivo virgen.
- ❑ Cerrar estas cajas con cinta adhesiva, por ejemplo Tesa Scotch<sup>®</sup>, y ponerla en la cámara de crecimiento a 25 °C y luz blanca 12 h/ 24 h, durante 3 días.



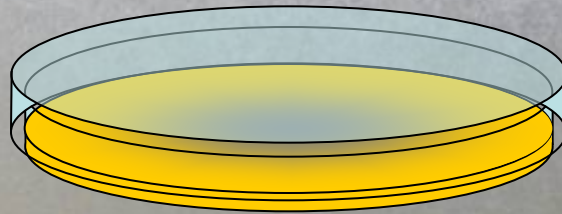
- ❑ Elegir la caja con colinas aisladas y transferir cada una en una caja de Petri nueva
- ❑ Así, se obtiene (3, en el dibujo) cepas muy probablemente monoesporicas.



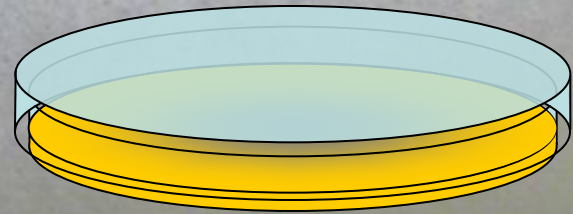
☐ Por mas seguridad se puede repetir todo el proceso.



Cepa 1



Cepa 2



Cepa 3

## Protocolo 6

# Multiplicación de cepas de *Magnaporthe* ssp

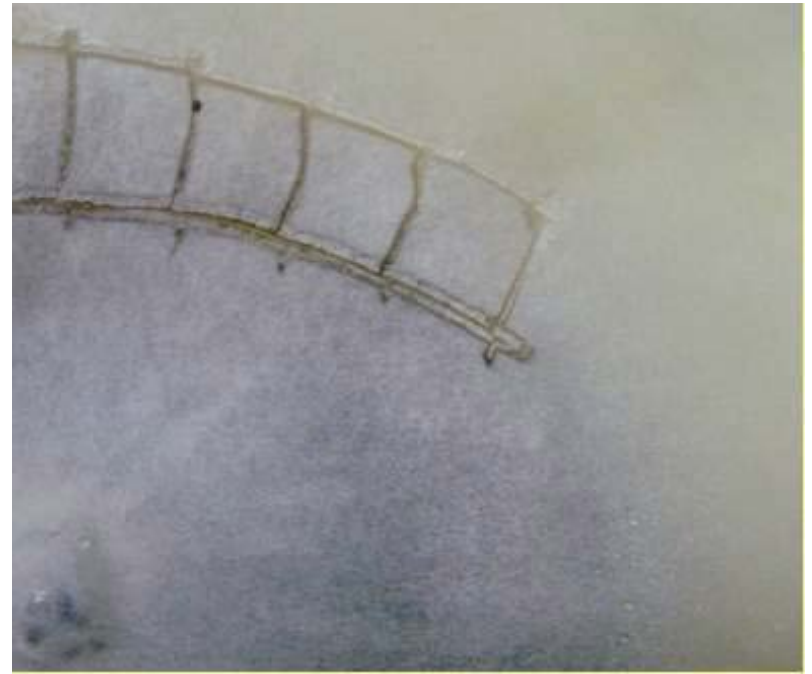
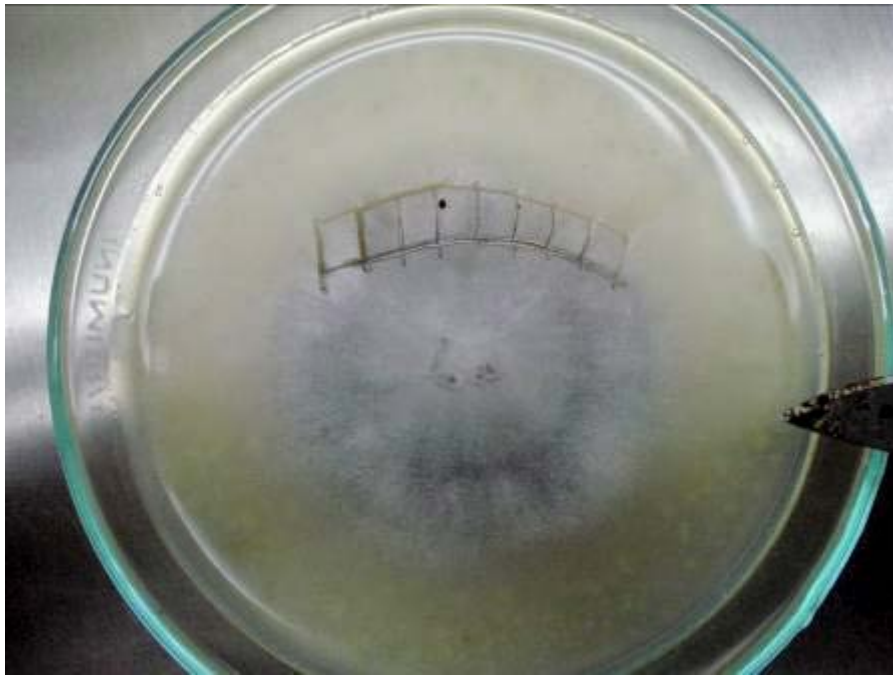
## 1. Introducción

Se debe multiplicar las cepas para obtener suficientemente de inóculo.



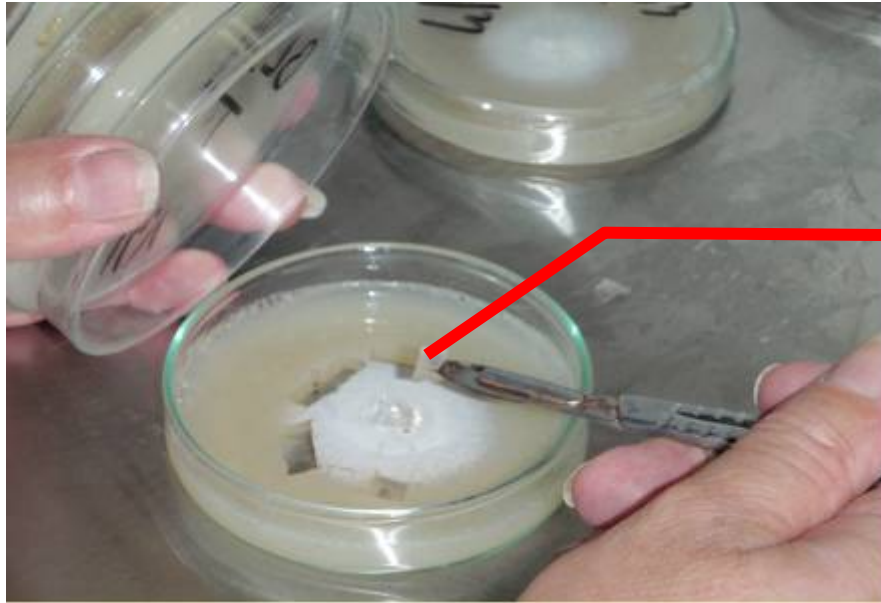
## 2. Protocolo

En condiciones estériles, con un bisturí (esterilizado con alcohol y mechero) se cortan pequeños cubos ( $\approx 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  x el espesor del medio de cultivo) a la bordura de la zona de crecimiento del hongo.



Con el mismo bisturí se hace la transferencia de estos cubitos en cajas de Petri con medio harina de arroz virgen.

Se puede poner un cubito al centro, o repartir 2, 3 o 4, por caja de Petri.



Se puede cerrar la caja de Petri con cinta adhesiva, por ejemplo, Tesa Scotch®.



Poner estas cajas de Petri a 25 °C y luz blanca 12 h/ 24 h (si no se puede, que sea en luz continua), durante, más o menos, 7 días (3 o 4 cubitos) hasta 12 días (1-2 cubitos).





### 3. Paso siguiente

Después de este tiempo se puede repetir todo el proceso de multiplicación y/o utilizar estos cultivos para obtener inoculo.



# Conservación de cepas de *Magnaporthe* ssp

## 1. Introducción

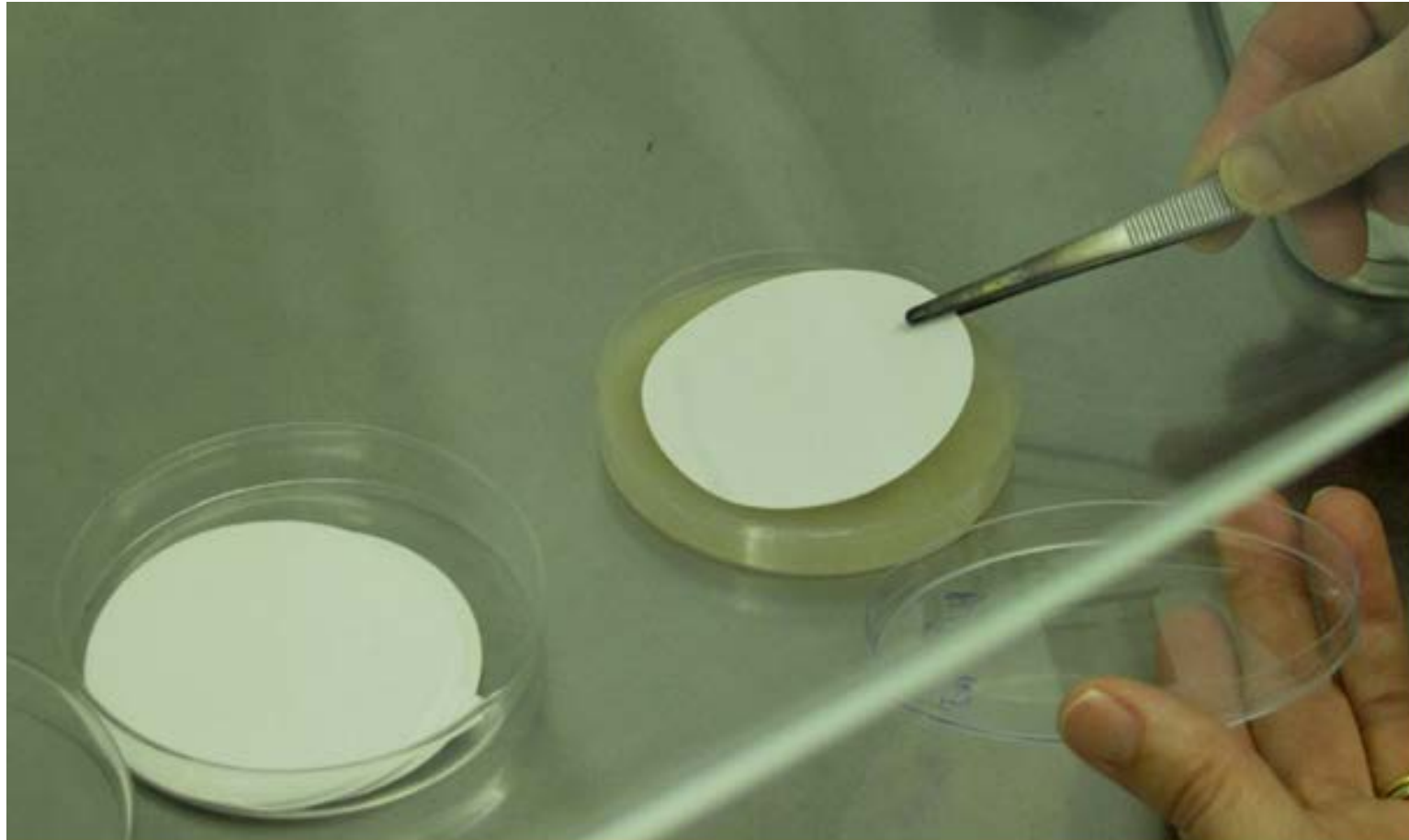
Por lo menos por seguridad, se debe guardar las cepas de forma durable (años), por ejemplo, para constituirse una colección.



## 2. Protocolo

Todo lo que sigue se realiza estérilmente.

Se poner un papel filtro sobre el medio de cultivo  
harina de arroz de cajas de Petri.



Con un bisturí se rasca la zona de crecimiento del hongo de una caja de Petri con el cultivo.





Con este bisturí cargado del hongo, se aplasta dicho hongo sobre toda la superficie del papel filtro.



Se cierra la caja de Petri con cinta adhesiva, por ejemplo, Tesa Scotch®.

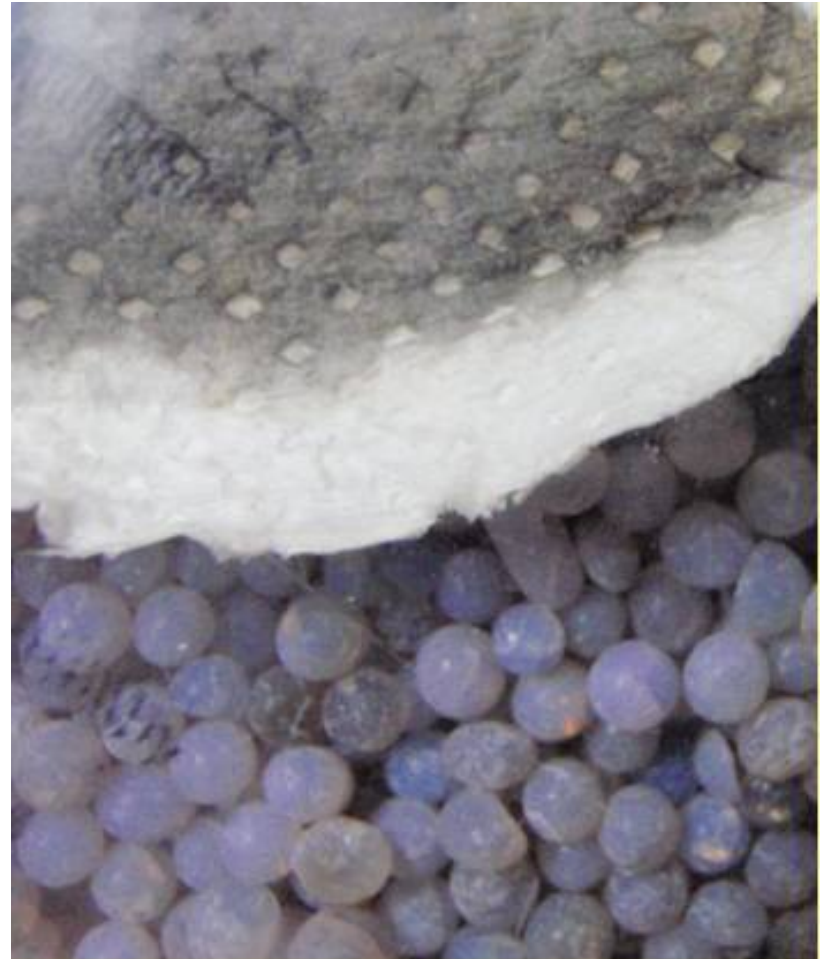
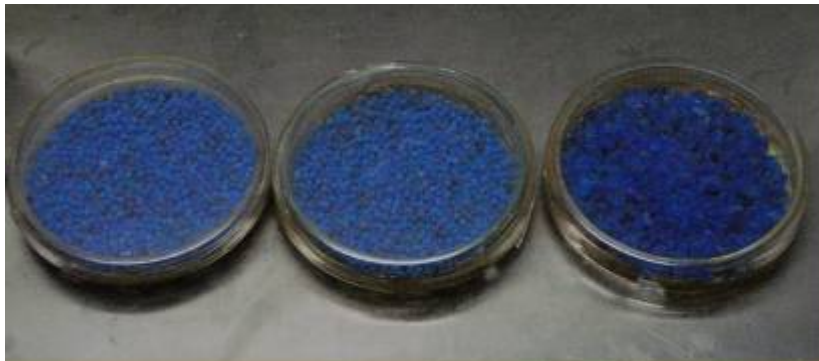


Se pone la Caja de Petri a 25 °C y luz blanca 12 h/ 24 h (si no se puede, que sea en luz continua), durante, más o menos, 7 días.



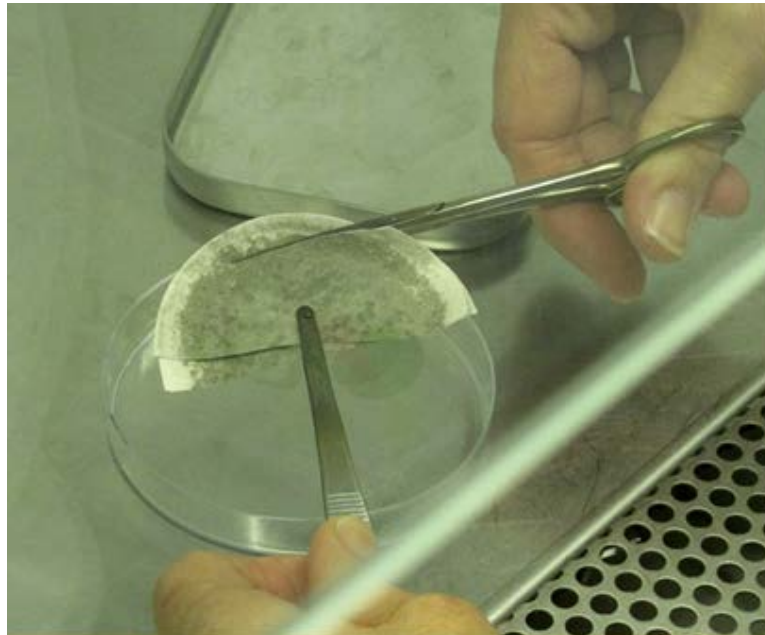
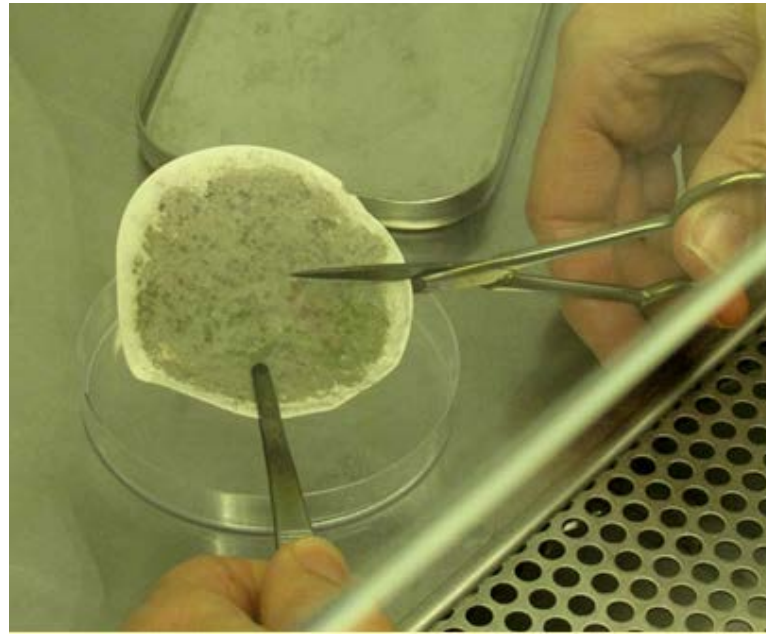
Después de esta semana, cuando el hongo cubre todo el papel filtro, se quita de la caja de Petri dicho papel para transferirlo en una caja de Petri vacía estéril con silica gel.

Se cierra la caja de Petri con cinta adhesiva, por ejemplo, Tesa Scotch®.

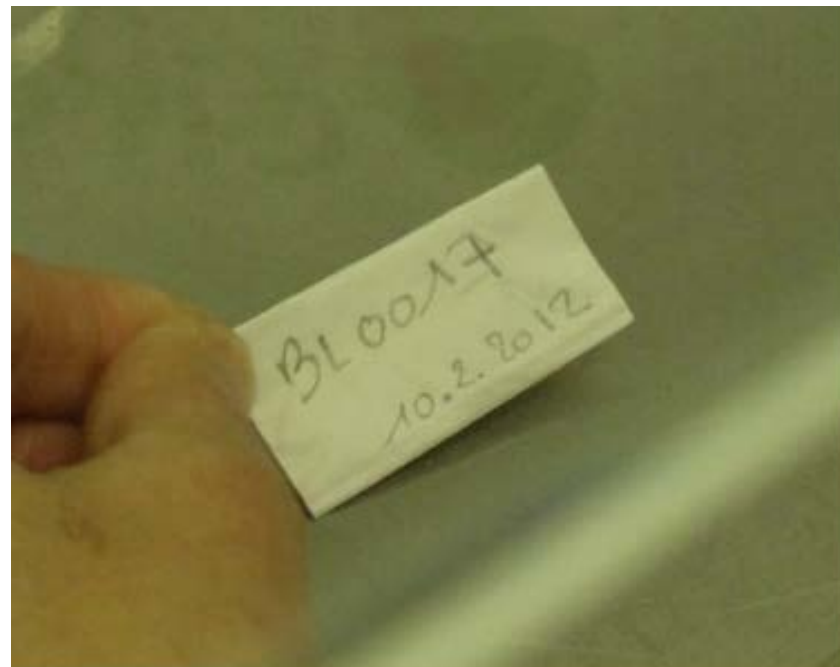




Una semana después,  
se corta el papel filtro  
seco en trocitos de  
papel, entonces con el  
hongo.



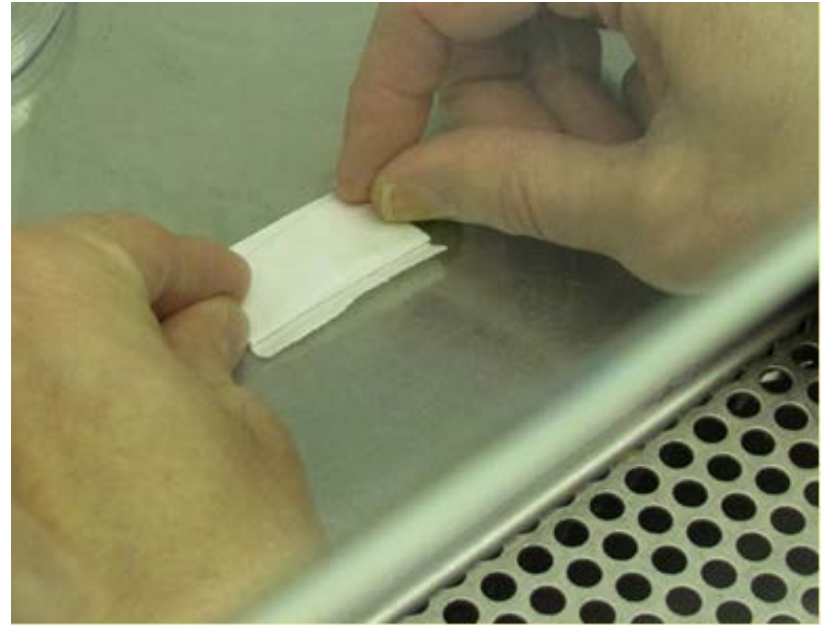
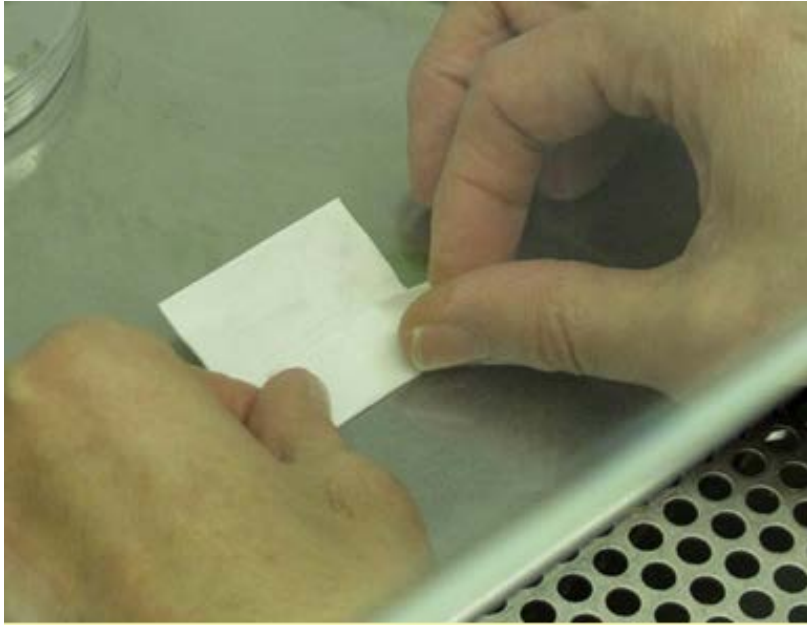
Se referencia los sobres de papel con los datos de la cepa y la fecha.



Se pone como veinte trocitos de papel filtro en cada uno.



Se cierra cada sobre plegándolo dos veces sobre si mismo.





Se desliza cada sobre de papel en una bolsa de plástico.

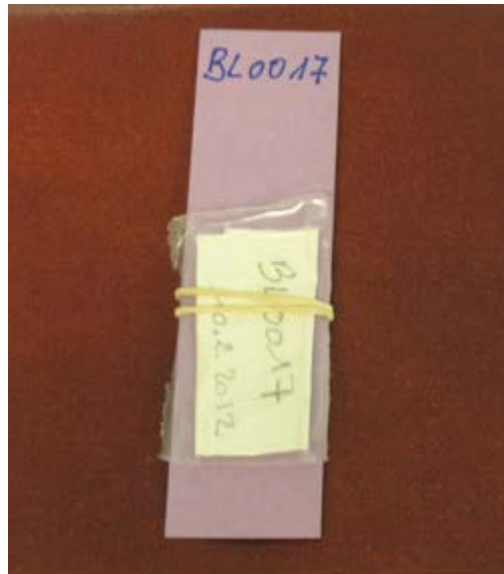


Se quita el aire introduciendo, en dicha bolsa, una cánula conectada a una bomba de vacío funcionando.

Manteniendo el vacío se cierra con la soldadora.

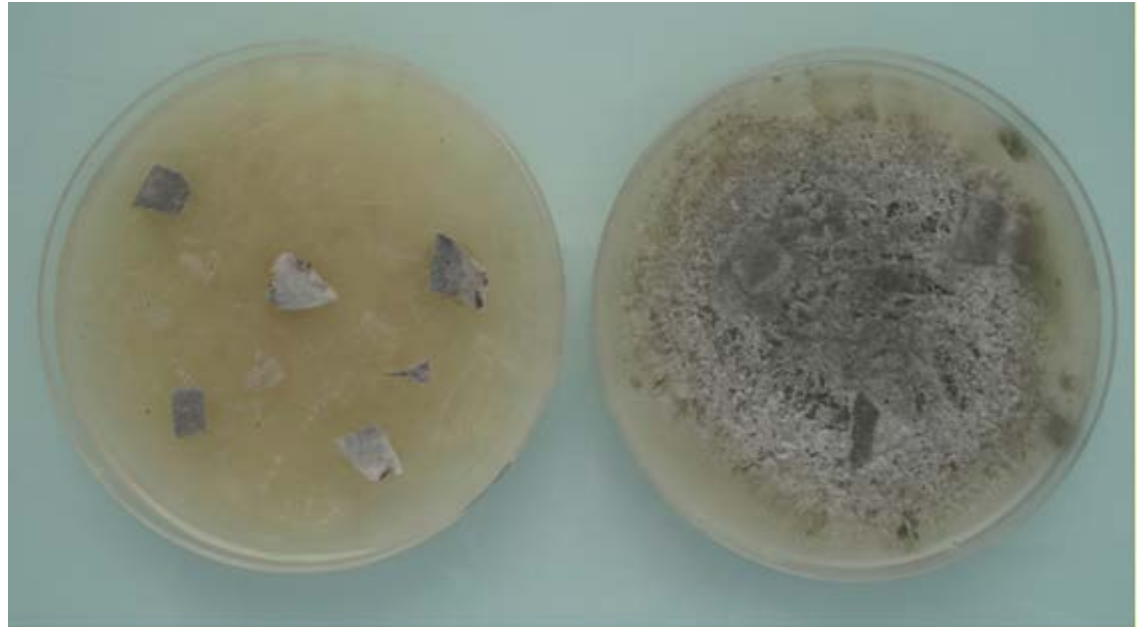
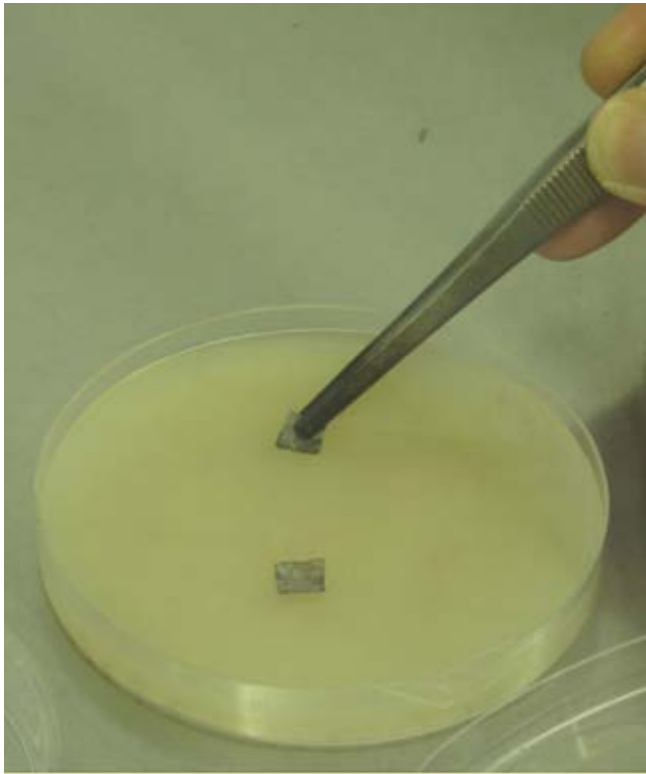


Se almacena el sobre a -20 °C.



### 3. Paso siguiente

Años después, se puede reiniciar el cultivo de una cepa rozando un trocito de papel sobre toda la superficie del medio de cultivo harina de arroz de una caja de Petri.





# Preparación del inoculo para la inoculación por una cepa de plantas en bandejas

## 1. Introducción

Se necesita preparar el inóculo para inocular plantas al fin de analizar su resistencia.



## 2. Protocolo

Este protocolo es para la inoculación de las plantas de una bandeja.

Por lo tanto se debe multiplicar todos los volúmenes por el número de bandejas.



Se prepara una solución de gelatina, con 0,5 g (por pulverizador manual) o 1 g (pulverizador con pequeño compresor) de gelatina para 100 ml de agua.

Se calienta 2 minutos al microonda (o de otra forma) para disolver la gelatina, y dejar enfriar.

La gelatina permite a gotas de la suspensión de esporas a quedar sobre las hojas al inocular.



Lo que sigue se hace de forma estéril, si se quiere guardar la caja de Petri del cultivo de la cepa, para que rebrota el hongo y un uso ulterior (multiplicación y/o obtención de inóculo).

En el caso contrario, se puede hacer sin condiciones estériles.

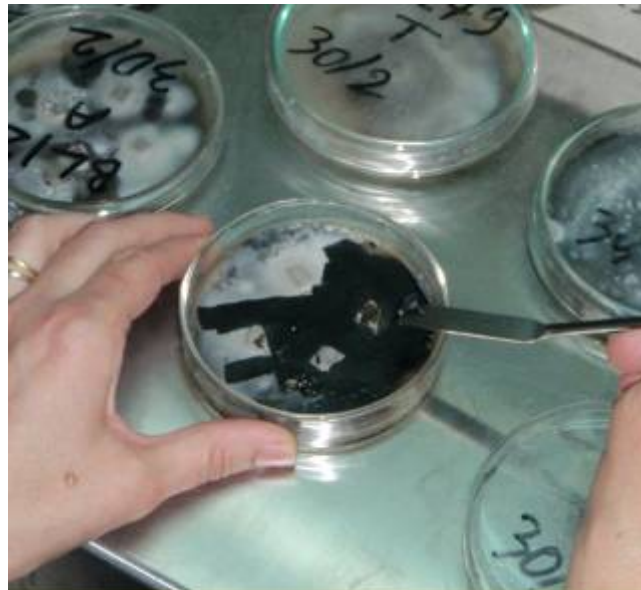




## ❑ Opción 1

Con una espátula (con un lado plano plegado a  $90^\circ$  sobre  $\approx 2$  mm) se rasca la superficie del medio de cultivo.

Después se pone el hongo, con la espátula, en los 10 ml de agua de un tubo.



## ❑ Opción 2

Se pone 10 ml en la caja de Petri y con un raspador o con un pincel se rasca la superficie del medio de cultivo.

Después se pone los 10 ml de suspensión del hongo en un tubo.

❑ Para ambas opciones, agitar fuertemente (a mano o con un agitador vortex) para separar las esporas (los órganos de propagación del hongo *Magnaporthe* ssp) del micelio (los filamentos del hongo).

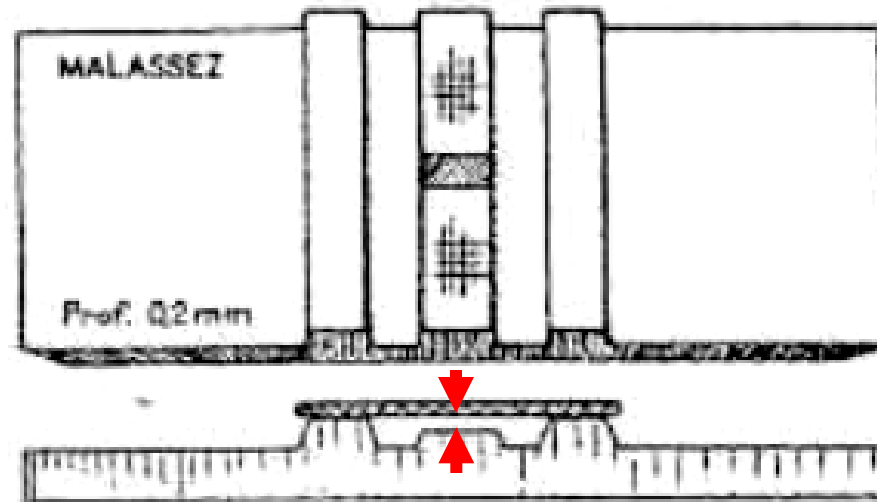


Se utilizan un tubo de ensayo y un embudo para filtrar los 10 ml sobre una tela (de malla  $\approx 50 \mu\text{m}$ ) (gasa tipo Hansaplast®) para separar las esporas ( $17\text{-}23 \mu\text{m} \times 7\text{-}11 \mu\text{m}$ ) del micelio.

Se completa con otros 10 ml de agua para amentar la posibilidad que esporas pasan a través de la tela.



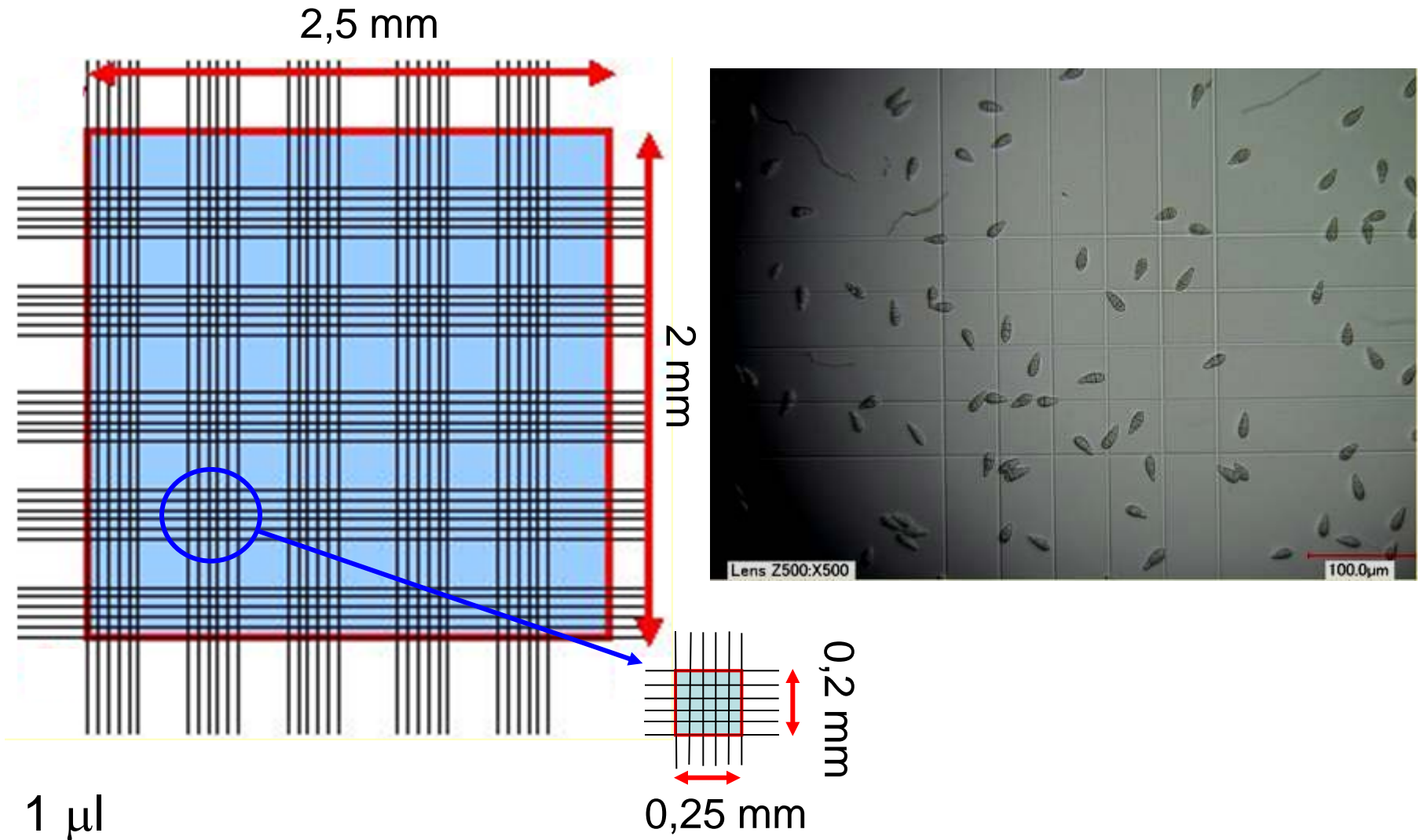
Se utiliza una célula de Malassez para medir la concentración en esporas.



Profundidad 0,2 mm



Se utiliza una célula de Malassez para medir la concentración en esporas.



Según las condiciones experimentales, más o menos favorables al desarrollo de síntomas, se busca una concentración final de inóculo de  $5 \cdot 10^4$  o  $5 \cdot 10^5$  esporas / ml.

Por lo tanto, antes de diluir de un factor 2 la suspensión de esporas, con 20 ml de la solución de gelatina (0,5% o 1%), se debe obtener 20 ml con una concentración de dicha suspensión de esporas  $10^5$  o  $10^6$  esporas / ml, respectivamente.

Por los detalles y ejemplos de cálculos ver el **Anexo 6** (Conteo de esporas) y el **Protocolo 8**.



### 3. Paso siguiente

De inmediato se realiza la inoculación.



# Inoculación de plantas en bandejas

## con una cepa

### 1. Introducción

Se necesita inocular plantas al fin de analizar su resistencia.





## 2. Materiales necesarios

Bandeja(s) de arroz (por lo menos un surco de 20 semillas por línea) (una variedad testigo susceptible por bandeja) con plantas de 3-4 hojas (3-4 semanas después de la siembra, según las condiciones de cultivo),

Inoculo(s) de una o varias cepas.



### 3. Protocolo

Al fin de la tarde, justo antes del crepúsculo, se pone una por una las bandejas sobre el torno motorizado o sobre una banqueta giratoria.

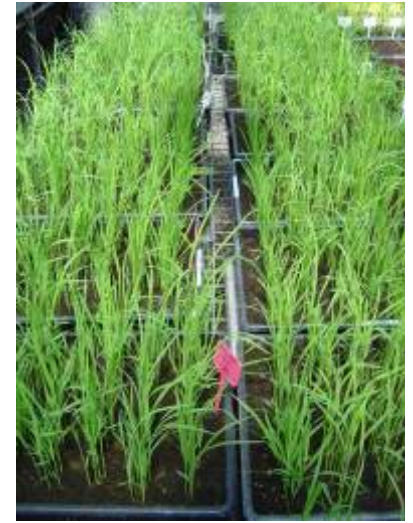
Mientras el torno hace girar la bandeja a velocidad moderada se pulveriza (compresor y pulverizador o pulverizador manual) 40 ml por bandeja.



Si se utiliza una banqueta giratoria, se pulveriza para distribuir 10 ml por un lado de la bandeja, después, a mano, se hace girar de un  $\frac{1}{4}$  de torno la bandeja para inocular con 10 ml por otro lado, etc. para los 4 lados.



¡Ojo! Siempre se debe repartir bien el inoculo sobre toda la bandeja sin tomar en cuenta que esta rellena de plantas, o que faltan la mitad de un lado, o que hay una planta, etc.



Porque, lo que es importante, es conocer el numero de esporas por  $\text{cm}^2$ .

Así, por ejemplo, con 40 ml de una concentración de  $5 \cdot 10^5$  esporas / ml pulverizados sobre una bandeja de 30 cm x 50 cm, la densidad de esporas por  $\text{cm}^2$  es de  $5 \cdot 10^5 \times 40 / (30 \times 50) = 13.333$  esporas /  $\text{cm}^2$  (del orden de  $10^4$  esporas /  $\text{cm}^2$ ).



Cada bandeja inoculada esta introducida de inmediato en la cámara de rocío mantenida cerrada (durante la tarde para que el agua, que moja los costales de tela de su piso, se calienta por efecto de invernadero o poner una bandeja con agua muy caliente).



Debido a la baja natural de la temperatura de la noche y a la transpiración de las hojas, aparece un rocío, sobre dichas hojas, muy favorable a la germinación de las esporas de *Magnaporthe* ssp, y por lo tanto al ataque de las plantas por la piriculariosis.





Después terminar las inoculaciones, limpiar rápidamente los pulverizadores con agua caliente para eliminar el poco de gelatina que podría quedar y obstruir dichos pulverizadores.



El día siguiente, retirar las bandejas de la cámara de rocío desde que dicho rocío desaparece, entre las 9 y las 11 h de la mañana según el clima.

Se pone estas bandejas en una casa de malla aislada de campo de arroz o trigo y de bandejas no inoculadas.





## 4. Paso siguiente

Después de 7-10 días se realiza la lectura de los síntomas.



# Lectura e interpretación de los síntomas de plantas inoculas en bandejas

## 1. Introducción

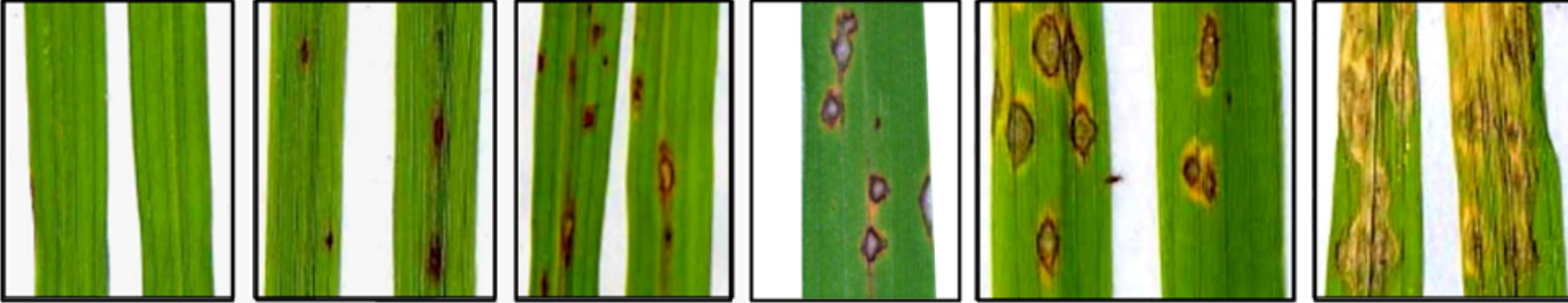
Como una semana después de la inoculación de las plantas en bandejas, se hace la notación de los síntomas y su interpretación para cumplir con los objetivos del ensayo.

Como en bandeja, las condiciones son muy lejanas de las condiciones de campo se puede únicamente estudiar la resistencia completa.



## 2. Protocolo

Se utiliza la escala 1 para calificar el tipo de las lesiones más desarrolladas (de nota más alta) observadas sobre cada línea o variedad.

Escala						
	<b>Tipo 1</b> Sin síntomas	<b>Tipo 2</b> Puntos o lesiones marrones de 1 a 2 mm  sin** centro diferenciado	<b>Tipo 3</b> Lesiones de 2 a 3 mm con <u>bordura</u> marrón  con centro diferenciado	<b>Tipo 4</b> Lesiones de 4 a 5 mm con <u>bordura</u> marrón  con centro diferenciado	<b>Tipo 5</b> Lesiones de más de 6 mm con <u>bordura</u> marrón claro o purpúrea con centro diferenciado	<b>Tipo 6</b> Lesiones de más de 6 mm sin <u>bordura</u> diferenciada

## Anexo 7

Después, se hace la interpretación con la escala 3.

Escala

3



Resistencia **C**ompleta

Resistencia **P**arcial

No hay **RP**\*

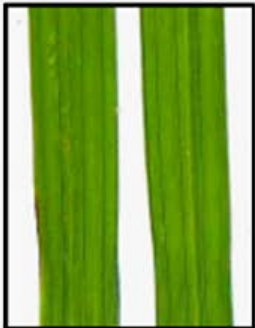
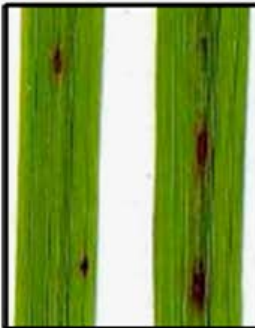
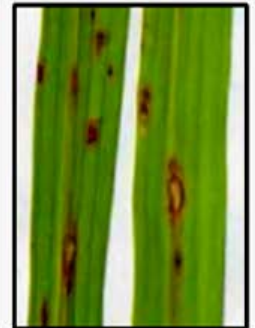



\*\*Sin centro diferenciado, que produce esporas, no se propaga epidemia a partir de estas lesiones (RC)

\*Casi no hay resistencia parcial



Si la repuesta de la línea o de la variedad a la cepa es de resistencia completa (RC de la escala 3), se dice que dicha línea o variedad y dicha cepa son incompatibles.

En el caso contrario, de resistencia parcial (RP y NR de la escala 3) sin el caso de tipo de lesión dudoso (tipo 2 de la escala 1), se dice que son compatibles.

Escala							
	2	Resistente	Resistente	Mediana-mente Susceptible	Susceptible	Susceptible	Altamente Susceptible
	3	Resistencia Completa		Resistencia Parcial			No hay RP*

\*\*Sin centro diferenciado, que produce esporas, no se propaga epidemia a partir de estas lesiones (RC)      \*Casi no hay resistencia parcial

### 3. Uso de los datos de interpretación

Como ejemplo, para los ensayos participativos de selección, en particular, para la resistencia parcial en el campo, se debe inocular una cepa que sea incompatible con las variedades comerciales vecinas de dichos ensayos (si es posible) y compatible con las líneas y variedades evaluadas.



San Pedro, productores socios

# Mejoramiento genético participativo

## 1. Introducción

Se debe realizar toda la selección en condiciones de los productores. Los productores participan a la realización de los ensayos.

Este trabajo, tipo EMPAS, se puede realizar por otros cultivos que el arroz (trigo, quínoa, etc.).



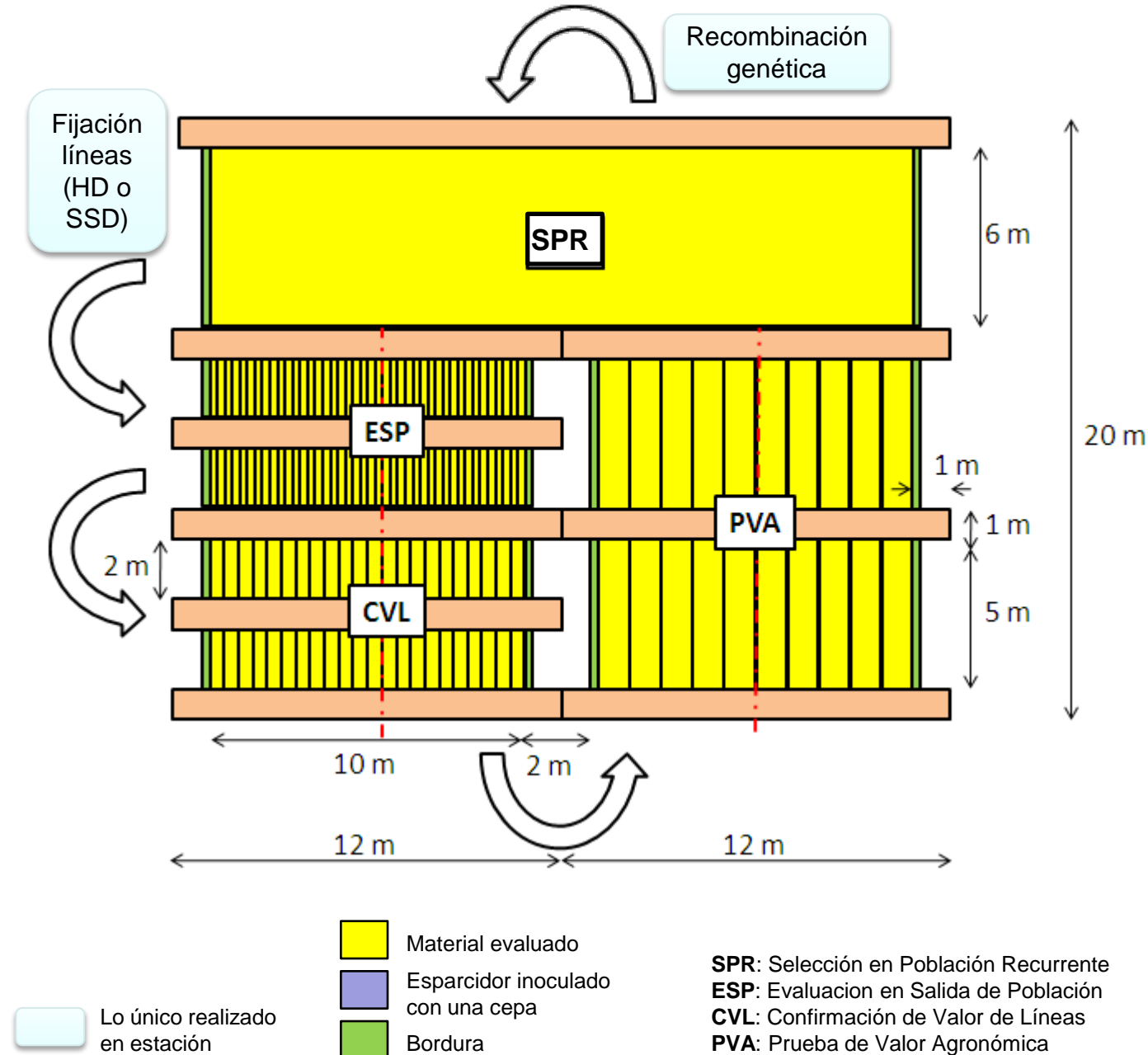
San Julián, productores socios



## 2. Protocolo

Estrategia de Mejoramiento Participativo del Arroz de Secano resistente a problemas abióticos y bióticos.

Campo de productor socio



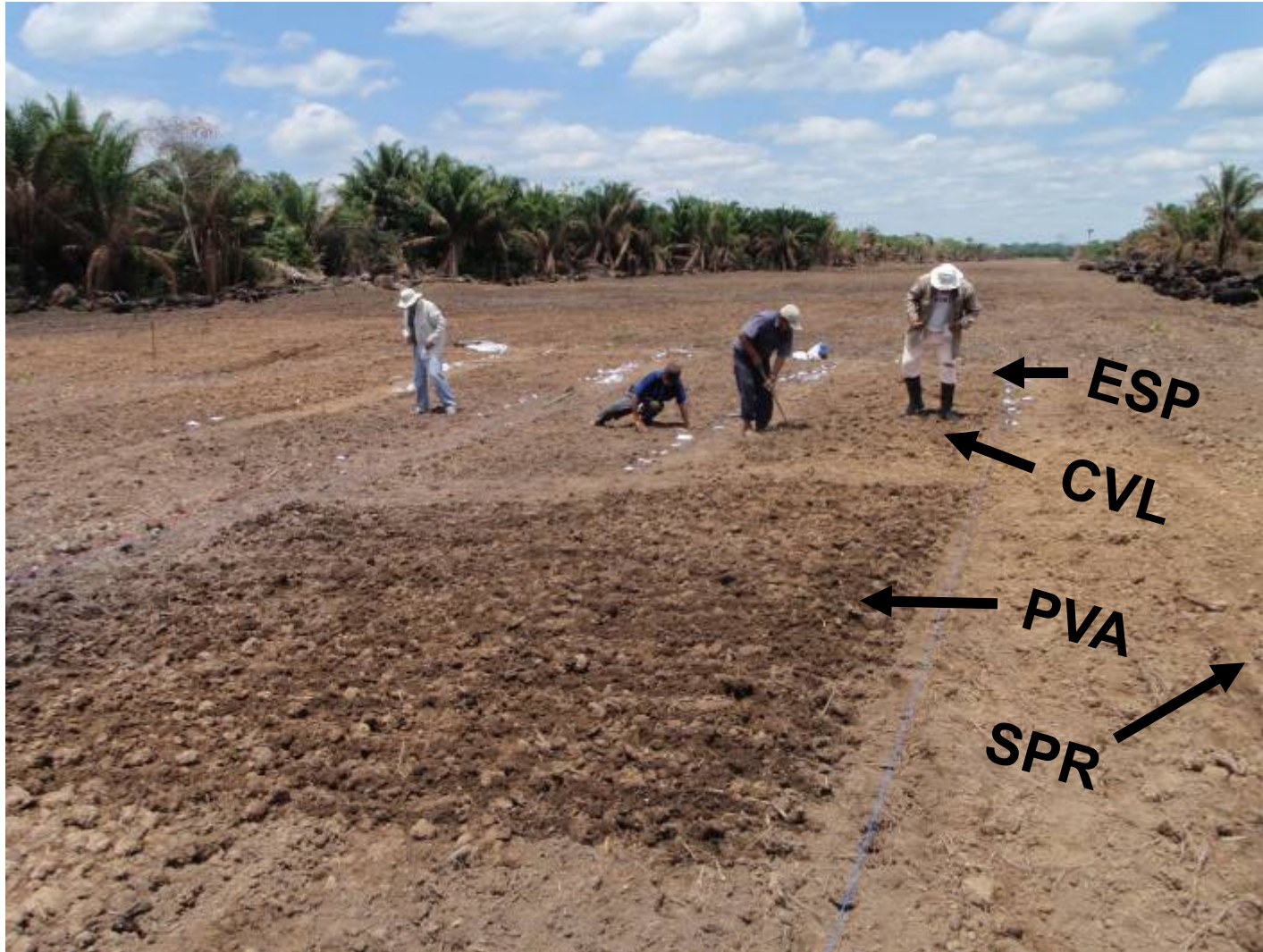
EMPAS

**SPR:** Selección en Población Recurrente  
**ESP:** Evaluación en Salida de Población  
**CVL:** Confirmación de Valor de Líneas  
**PVA:** Prueba de Valor Agronómica



### 3. Ejemplo

Siembra en San Julián, en “mecanizado” arroz de secano estricto



ESP  
Evaluación Salida  
Población

CVL  
Confirmación Valor  
de Líneas

PVA  
Prueba valor  
Agronómica

SPR  
Selección en  
Población  
Recurrente



# Selección recurrente

## 1. Población recurrente

La selección recurrente consiste primero en reemplazar

- varias poblaciones F2 (resultado del cruzamiento de dos padres y de la autofecundación de la F1, caso de una especie autogama) o
- varias S1 (resultado del cruzamiento de dos padres y de la fecundación cruzada de la S0, caso de una especie alogama)
- por una población recurrente.



En lugar de perder las poblaciones F2 o S1 se realiza un mejoramiento poblacional de la población recurrente.

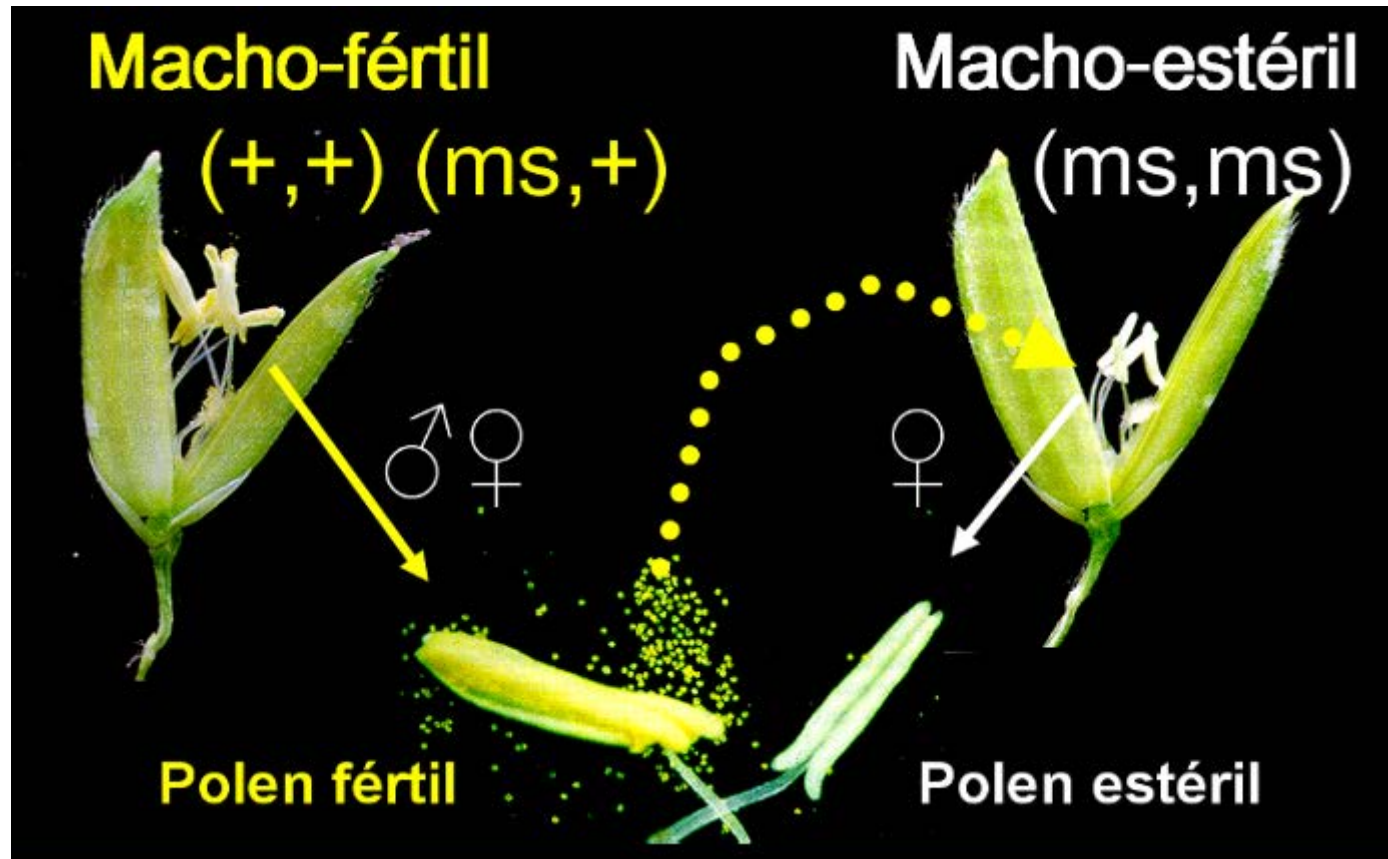
Este mejoramiento se hace por ciclos de selección de plantas o líneas y de recombinación genética.





## 2. Macho-esterilidad

Para facilitar esta recombinación genética, cuando es posible, se usa un gen de macho-esterilidad para que las fecundaciones cruzadas se hagan espontáneamente al campo (no controladas) y no manualmente.





### 3. Creación de variedades

Después, al salir de la población recurrente es similar a la creación varietal al salir de una población F2 o S1.

Sino que la selección puede/debe ser muchas mas drásticas porque la población recurrente esta mantenida.



San Julián

# Ajuste de una población recurrente

## 1. Introducción

### ☐ Arroz

Todas las resistencias completas del arroz son rápidamente superadas por la piriculariosis.



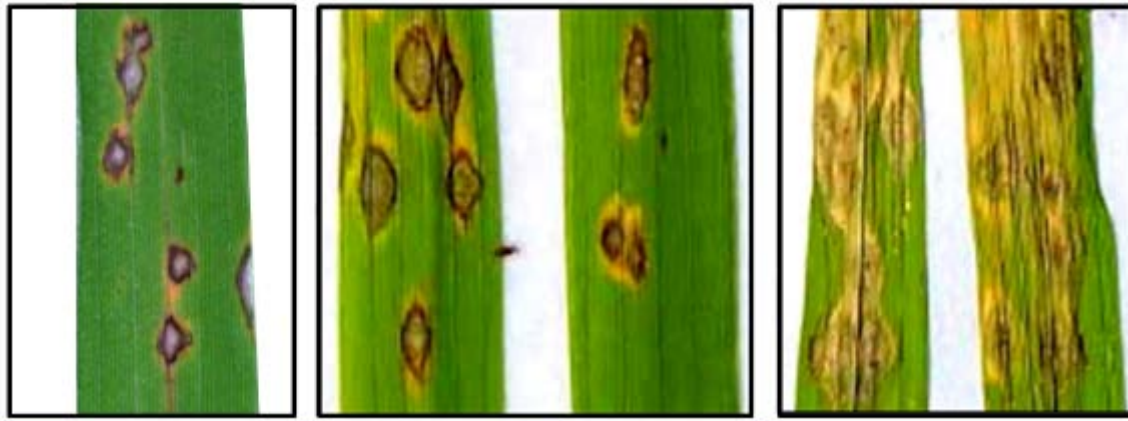
Resistencia completa

Pero hay variedades, aunque sean muy pocas, con resistencia parcial nunca superada por la enfermedad

Por lo tanto, se privilegia la obtención de variedades de arroz con resistencia parcial.

Pero, no se puede ver la resistencia parcial si esta escondida por una resistencia completa no superada por la enfermedad.

Por esta razón, se necesita eliminar de la población recurrente todas las resistencias completas no superadas por la cepa del parásito usada para inocular los esparcidores (variedad susceptible a dicha cepa).



R. parcial



## ❑ Trigo

A la fecha (15-03-12), no se conoce resistencia completa a la piriculariosis del trigo, por lo tanto, no se necesita ajustar las poblaciones recurrentes.





## 2. Materiales necesarios

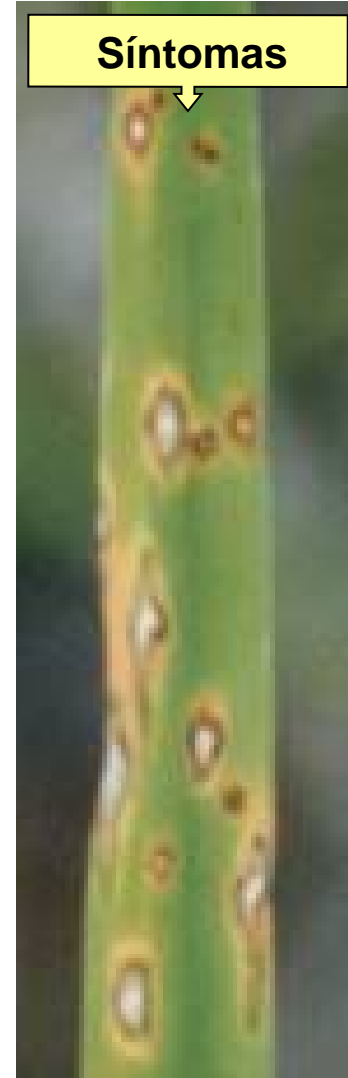
Una cepa que no supera la resistencia competa de las variedades comerciales, *i. e.* incompatible con dichas variedades vecinas del ensayo de selección.

Una población recurrente.



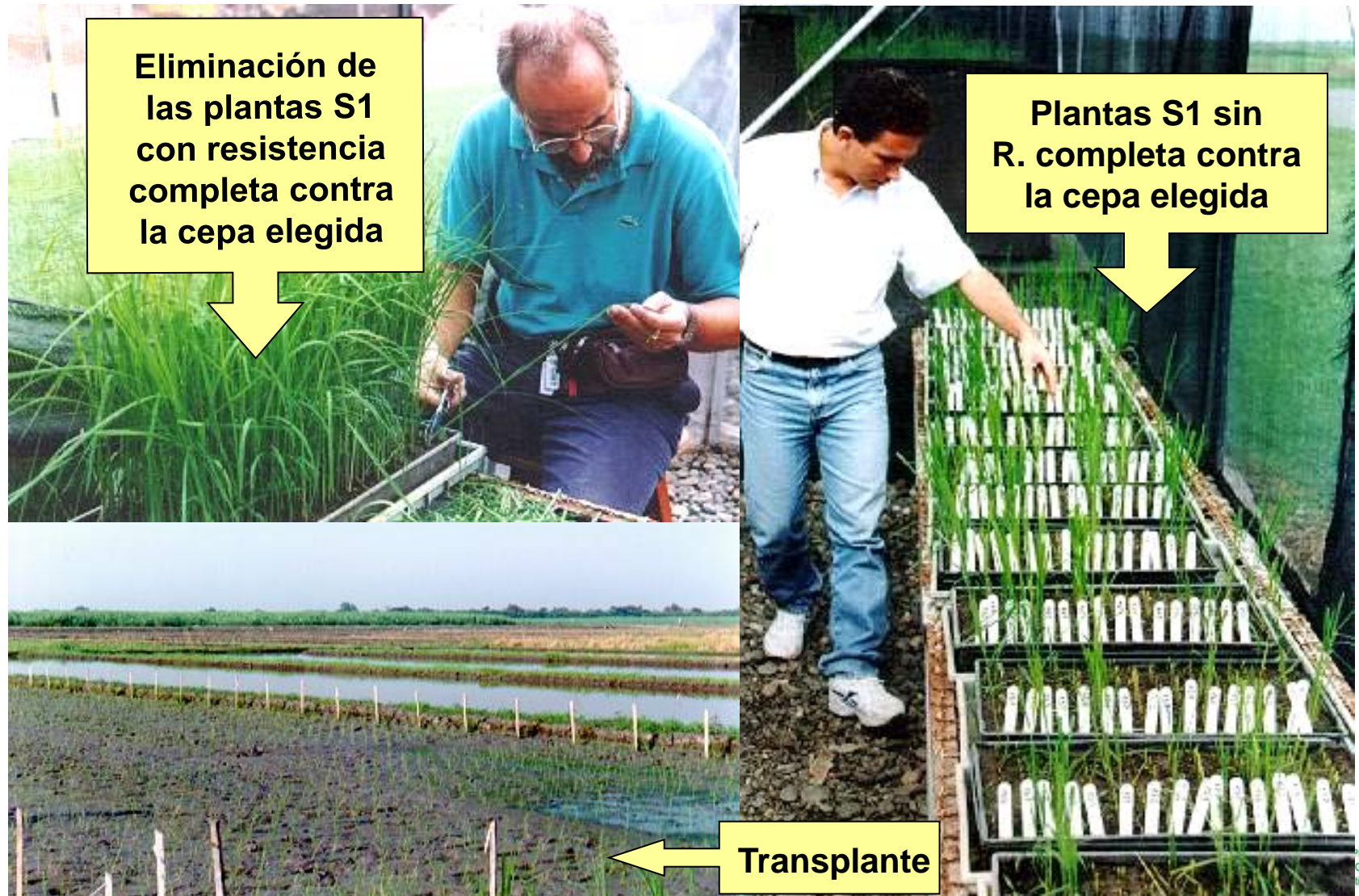
### 3. Protocolo

Se inocula las bandejas donde se sembró la población recurrente como precedente.





Se hace la lectura como precedente, pero, después, en lugar de interpretar, se destruyen, cortándolas con tijeras, las plantas que no son claramente susceptibles a la cepa elegida.



A floración se indica las plantas macho-estériles con un alambre rojo y la macho-fértiles con un alambre azul.

Se obtiene semillas de la población recurrente ajustada (es decir definitivamente sin plantas con resistencia completa a la cepa inoculada) por cosecha de las plantas macho-estériles.





## 4. Paso siguiente

Implementación de la estrategia de mejoramiento genético participativo para, entre otros, resistencias a factores bióticos (insectos, nematodos, hongos, bacterias, virus) y a factores abióticos (acidez o salinidad de los suelos, falta de fertilización, sequía o inundación, falta de brillo solar, etc. según las condiciones agroecológicas).



San Julián

# Obtención del inóculo para el campo

## 1. Introducción

Para evaluar la resistencia parcial se necesita que, por lo menos, predomina, en el campo de selección, una cepa que supera la resistencia completa del arroz estudiado – una población ajustada y/o las líneas seleccionadas extraídas de dicha población – por lo tanto se usara un inóculo de esta cepa para infectar los esparcidores.



## 2. Materiales necesarios

Una cepa que no supera la resistencia completa de las variedades comerciales vecinas del ensayo de selección, semillas de una variedad bien susceptible a esta cepa.





### 3. Protocolo

Se sembra una bandeja de la variedad bien susceptible a la cepa, que se quiere inocular en el campo, por metro cuadrado de esparcidor.

Se inocula estas bandejas con esta cepa.





Diez días después se cosechan con tijeras las hojas infectadas y se pone dichas hojas a secar al aire ambiente bajo media sombra.



El inoculo para el campo es constituido por las hojas secas que se ponen en costales guardados en un ambiente seco y temperatura moderada.

Se necesitaran 12-15 g de hojas secas (inoculo) por metro cuadrado de esparcidor.



# Inoculación de esparcidores en el campo

## 1. Introducción

Para evaluar la resistencia parcial se necesita que, por lo menos, predomina, en el campo de selección, una cepa que supera la resistencia completa del arroz estudiado – una población ajustada y/o las líneas seleccionadas extraídas de dicha población – por lo tanto, se debe infectar los esparcidores con el inóculo de esta cepa





## 2. Protocolo

Si se puede, los esparcidores (de una variedad bien susceptible a la cepa inoculada) son sembrados 15 días antes del arroz a evaluar, sino, son sembrados en mismo tiempo que las líneas y variedades a evaluar.





Si se puede se trata la semilla de los esparcidores y (si se siembran en mismo tiempo que ellos) la semilla de las líneas y variedades a evaluar,

con media dosis de un fungicida sistémico (que se propaga en toda la planta), por ejemplo, con 0,5 g del producto comercial Bim® 75 WP (75% de molécula activa, tricyclazole; polvo mojable) por cada kilogramo de semillas.

Esto para evitar que la piriculariosis se desarrolla antes de la inoculación.



Cuando las plantas de los esparcidores tienen 3 hojas se averigua si hay piriculariosis en el campo:

☐ Si ya hay piriculariosis

Se pospone la inoculación de una semana



Se hace un tratamiento foliar con media dosis de un fungicida curativo de contacto (que no se propaga en toda la planta (así las nuevas hojas no son protegidas) por ejemplo, con 0,5 l/ha del producto comercial (pc) Hinosan® EC 500 (500 g de molécula activa, edifenfos, por litro de pc; concentrado emulsionable).

¡Ojo! por si acaso, no aplicar este fungicida hasta 10 días después de haber aplicado propanil.



☐ Si no hay piriculariosis  
Se realiza la inoculación.



Santa Rosa, Meta, Colombia



Se realiza la inoculación, sencillamente, por dispersión sobre los espaciadores de 12-15 g de inóculo (hojas infectadas secas) por metro cuadrado.

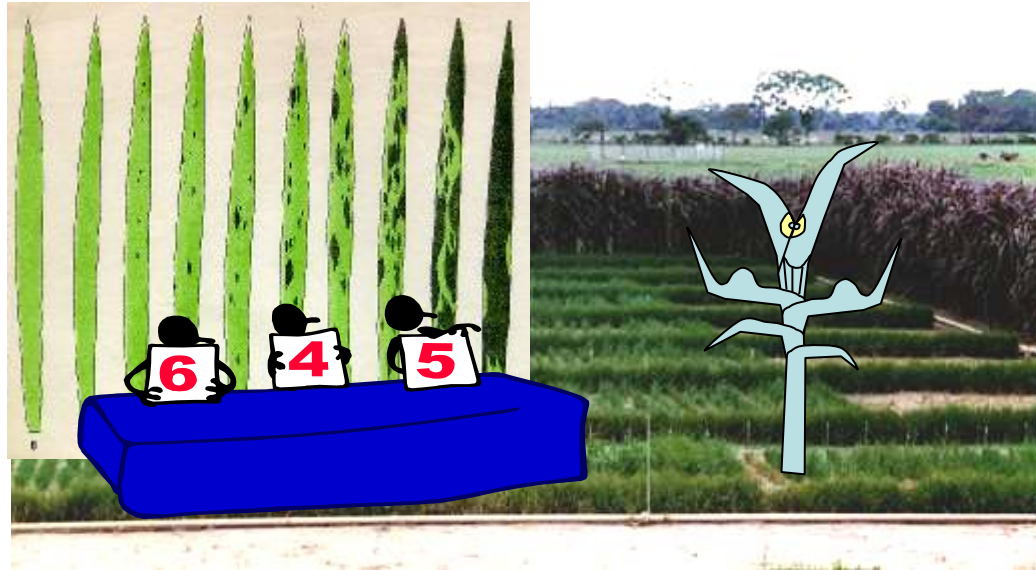




# Notación e interpretación de los síntomas de campo y selección

## 1.Introducción

Para realizar la selección para la resistencia parcial a la piriculariosis, se necesita calificar las plantas de una población recurrente y/o líneas extraídas de dicha población y/o variedades con respecto a esta enfermedad.



## 2. Protocolo

### ❑ Escalas de notación

Se pueden utilizar escalas de notación de la piriculariosis foliar del arroz para la piriculariosis del trigo.



# ❑ Plantas de población recurrente

## ❖ Piriculariosis de la hoja (arroz y trigo)

Al fin del ciclo de cultivo se busca en la población las plantas más resistentes según las escalas 1 y 2.

**Tipos de lesión foliar de piriculariosis (*Magnaporthe grisea*) del arroz (1) e interpretaciones (2 y 3)**



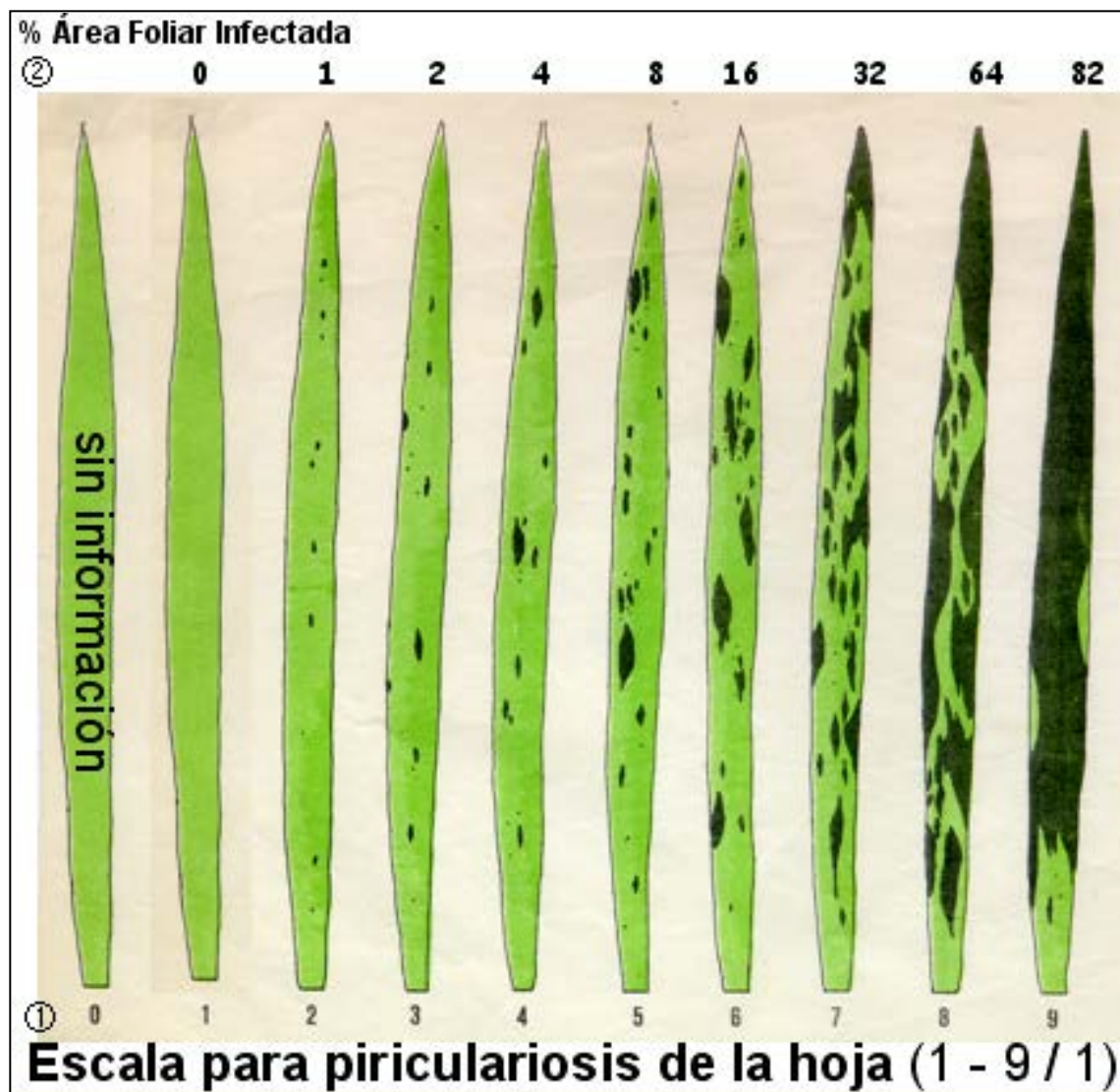
Anexo 7

Escala						
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6
1	Sin síntomas	Puntos o lesiones marrones de 1 a 2 mm <b>sin**</b> centro diferenciado	Lesiones de 2 a 3 mm <b>con</b> bordura marrón <b>con</b> centro diferenciado	Lesiones de 4 a 5 mm <b>con</b> bordura marrón <b>con</b> centro diferenciado	Lesiones de más de 6 mm <b>con</b> bordura marrón claro o purpúrea <b>con</b> centro diferenciado	Lesiones de más de 6 mm <b>sin</b> bordura diferenciada
2	<b>R</b> esistente	<b>R</b> esistente	<b>M</b> ediana-mente <b>S</b> usceptible	<b>S</b> usceptible	<b>S</b> usceptible	<b>A</b> ltamente <b>S</b> usceptible
3	<b>R</b> esistencia <b>C</b> ompleta		<b>R</b> esistencia <b>P</b> arcial			<b>N</b> o hay <b>R</b> P*

\*\*Sin centro diferenciado, que produce esporas, no se propaga epidemia a partir de estas lesiones (RC)

\*Casi no hay resistencia parcial

Se utiliza en primero las escalas 1 y 2 y, si hay demasiado plantas seleccionadas, se usa la escala 4.





## ❖ Piriculariosis del cuello (arroz)

Al fin del ciclo de cultivo se trata observar si hay lesiones castañas (a veces con gris) sobre los cuellos de las panojas.

El cuello es la parte entre los dos últimos nudos antes de la panoja y el primero 1/3, que sigue, del rachis de la panoja.

Se seleccionan las plantas sin lesiones o, si no hay, las plantas de lesiones más pequeñas.



## ❖ Piriculariosis de la espiga (trigo)

Al fin del ciclo de cultivo se seleccionan, en la población recurrente, las plantas sin o con menos daños en las espigas, utilizando la escala 5:

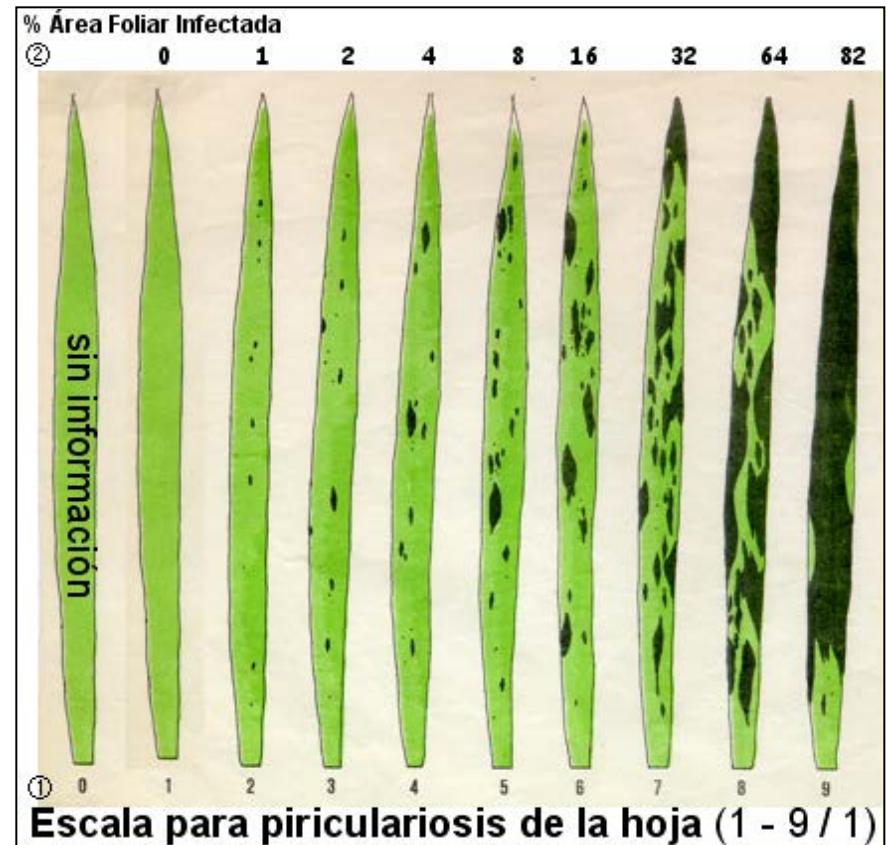


# ❑ Líneas y/o variedades

## ❖ Notación

### ■ Piriculariosis de la hoja (arroz y trigo)

Desde los primeros síntomas se hace una notación cada semana utilizando la escala 4:



- Piriculariosis del cuello (arroz)

En el surco central de cada parcela elemental se hace un paso al interior ( $\approx 1\text{m}$  para evitar el efecto de bordura), se toma con una mano 10 panojas al azar y con la otra mano se facilita el conteo de cuellos afectados.

Se hace lo mismo en el centro del surco y 1 m antes de su fin.

A partir del número de cuellos infectados sobre 30 ( $10 + 10 + 10$ ) se estima el porcentaje de cuellos afectados sobre el surco y en la parcela.



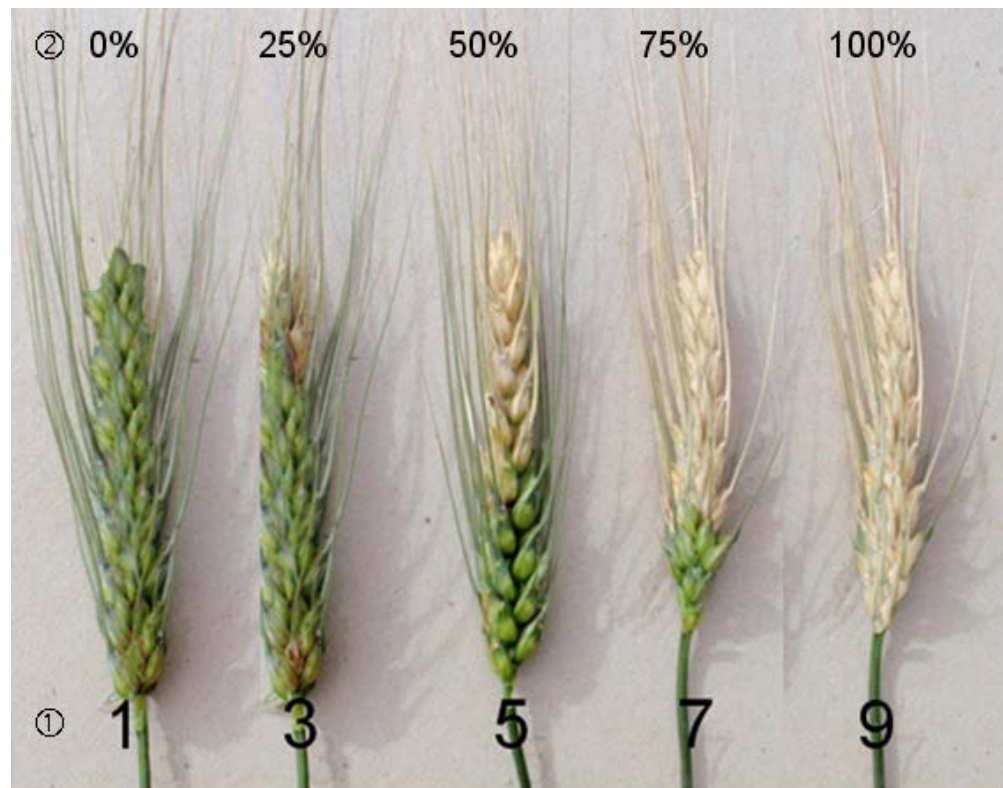


## ■ Piriculariosis de la espiga (trigo)

En el surco central de cada parcela elemental se hace un paso al interior ( $\approx 1\text{m}$ , para evitar el efecto de bordura), se toma con una mano 10 espigas al azar y con la otra mano se facilita la observación de cada una y se dicta a un ayudante cada nota usando la escala 5:

Se hace lo mismo en el centro del surco y 1 m antes de su fin.

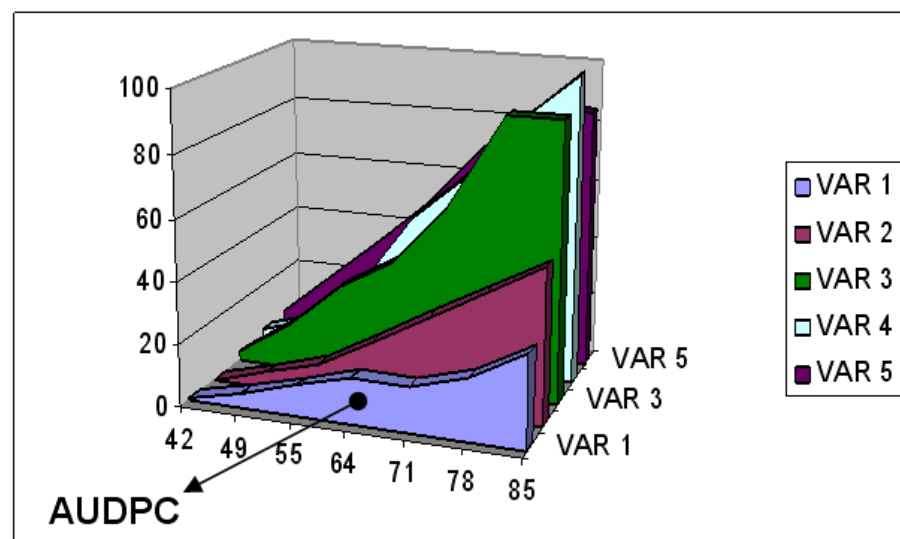
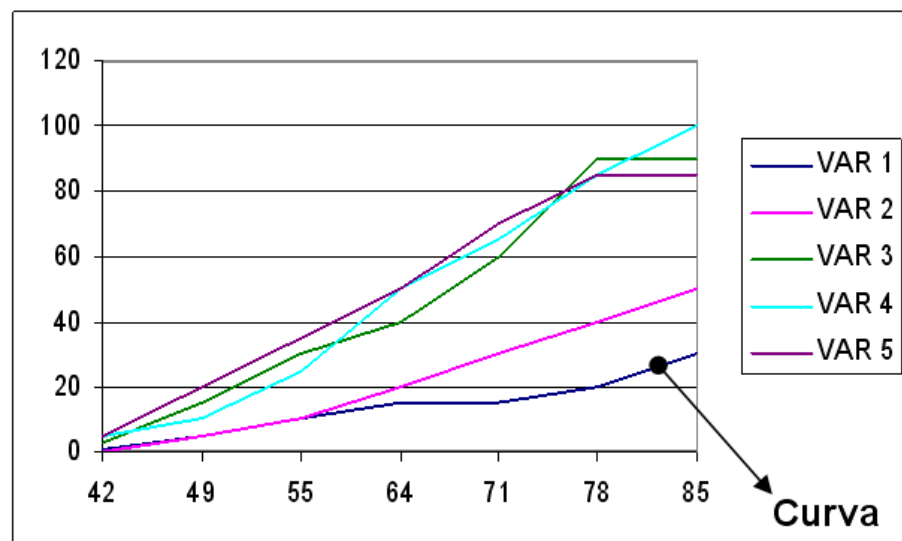
El promedio de las notas corresponde a la severidad de la piriculariosis de la espiga, el porcentaje de espigas infectadas corresponde a la incidencia de la enfermedad.



## ❖ Interpretación y selección

Cuando no hay diferencias obvias, en caso de selección participativa, o en el caso general, la selección utiliza los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos en el diseño experimental del ensayo.

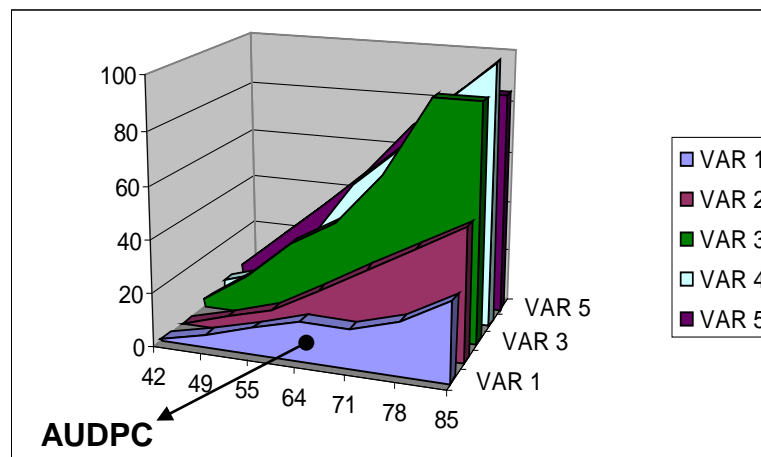
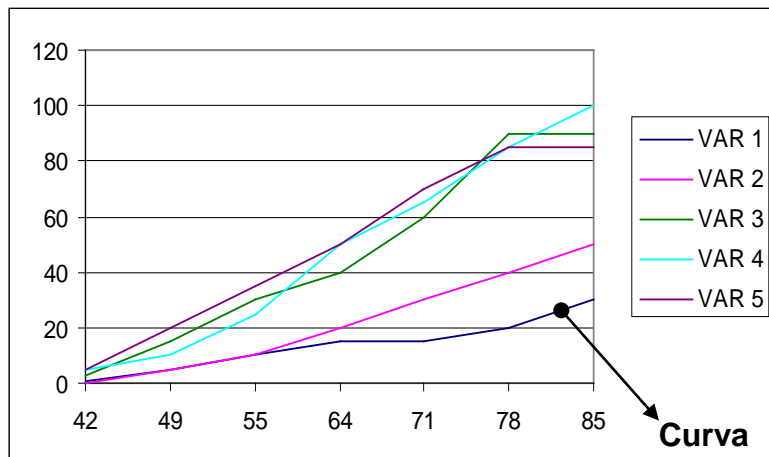
En particular, para la piricularia de la hoja, se utiliza el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC en ingles):



% superficie foliar infectada / días después de la siembra

# Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (acrónimo ingles AUDPC)

## 1. Definición



## 2. Calculo con Excel

	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	<b>Porcentaje de aera foliar infectada</b>								
5	<b>Variedades</b>	<b>Dias</b>							<b>AUDPC</b>
6		42	49	55	64	71	78	85	
7	VAR 1	1	5	10	15	15	20	30	581,00
8	VAR 2	0	5	10	20	30	40	50	932,50
9	VAR 3	3	15	30	40	60	90	90	2018,00
10	VAR 4	5	10	25	50	65	85	100	2070,00
11	VAR 5	5	20	35	50	70	85	85	2192,50
12									
13	Copiar esta formula en la celda J7			$= ((D7+C7)/2)*($D$6-$C$6)+((E7+D7)/2)*($E$6-$D$6)+((F7+E7)/2)*$					
14	Copiar la celda J7 en las otras			$($F$6-$E$6)+((G7+F7)/2)*($G$6-$F$6)+((H7+G7)/2)*($H$6-$G$6)+$					
15	(J8 => J11)			$((I7+H7)/2)*($I$6-$H$6)$					

## 3. Referencia

CIP's protocol for standard evaluation of potato clones for resistance to Late Blight (LB) in the field: experimental



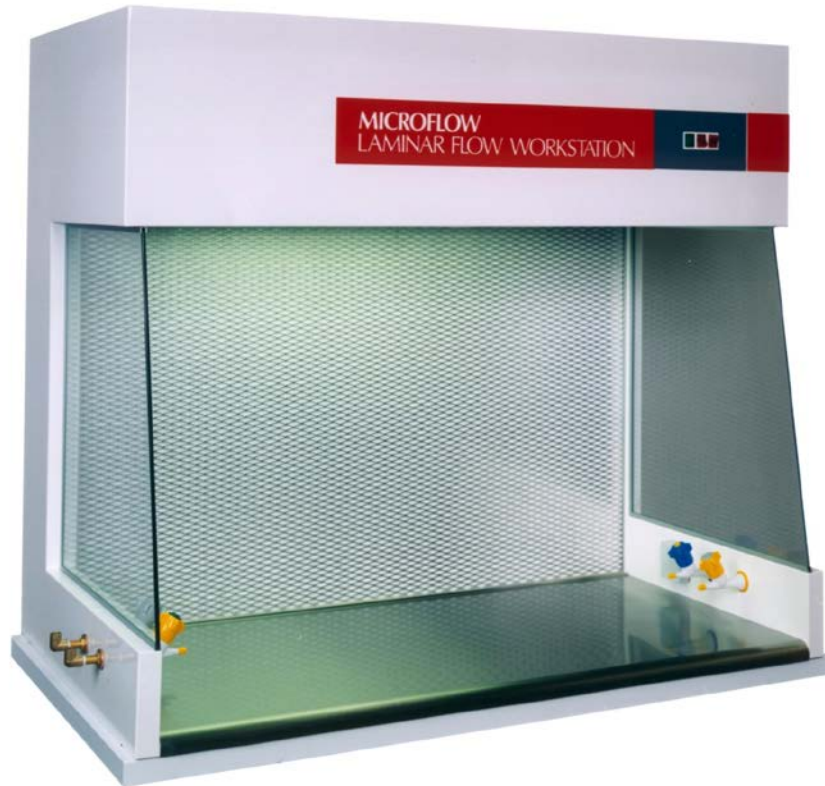
UMR - BGPI  
Biologie et Génétique  
des Interactions Plante-Parasite



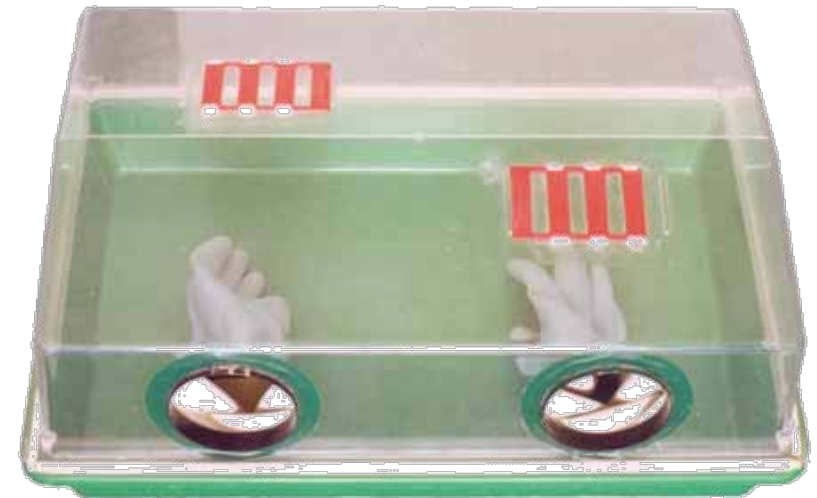


# 1. Equipamientos

Camera de flujo laminar



Caja de guantes (incomodo)



# Autoclave



Olla a presión (!Ojo! necesita de balones de cuello corto)



Destilador (agua destilada)  
Columna para cambio de iones  
(agua permutada)



Agua destilada de hogar  
(batería, plancha)  
Agua de lluvia bien filtrada  
Agua "climatizada" (de  
condensación de  
acondicionador de aire)  
perfectamente filtrada



Estufa (esterilización a 200 °C)



Horno de cocina a gas

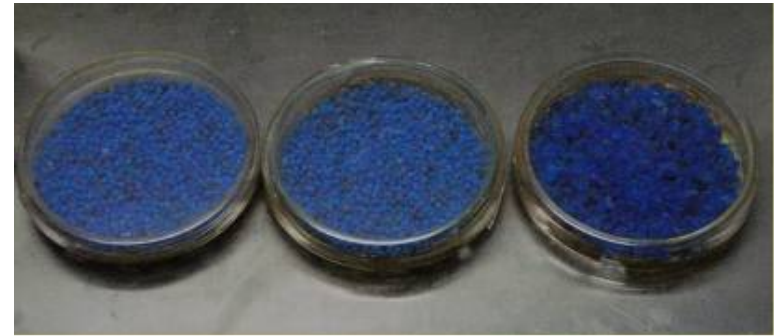




Estufa (deseccación a 37 °C)



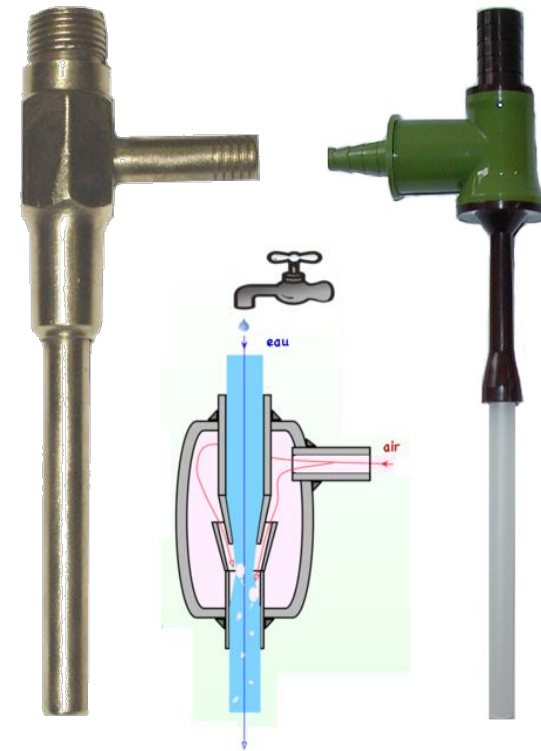
Caja hermética con cloruro de calcio (atención en lo que la caja no se llene de agua) o con silicagel



## Bomba a vacío eléctrica (almacenamiento cepas)



## Bomba a vacío manual, trompa de agua



## Cámara para el cultivo de cepas

- Luz / oscuridad – 12 h / 12 h
- 25 °C



## Mesa o arcón vítreo (a experimentar)

- Ventana luminosa sin insolación directa
- Temperatura del cuarto (climatizado en región tropical)



## Compresor y pulverizador (inoculación)



## Pulverizador manual (!Ojo! bajar el % de gelatina)





## Torno motorizado (inoculación)



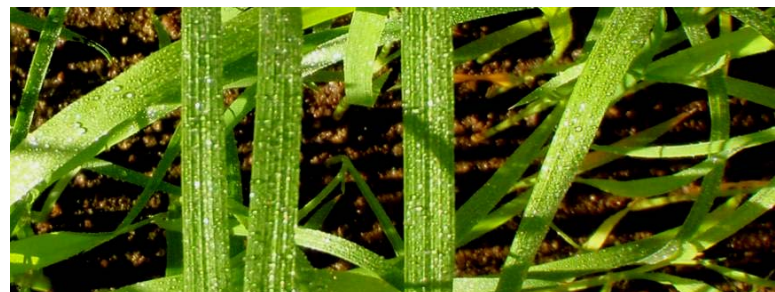
## Banqueta giratoria



Estufa climatizada húmeda  
(después de inoculación)



Cámara de rocío casera  
(plástico oscuro sobre  
armadura de madera, costales  
mojados sobre su piso)



## 2. Petueños materiales

### Vidriería de laboratorio

!Cuando no esta accesible! ☹



Equivalente en vidriería de cocina (atención, el vidrio no fino no soporta las diferencias bruscas de temperatura)





Bandeja especial para cultivo



Caja para gato, barreño, etc.  
(atención, rigidez suficiente  
para el transporte con tierra  
húmeda)





### 3. Productos

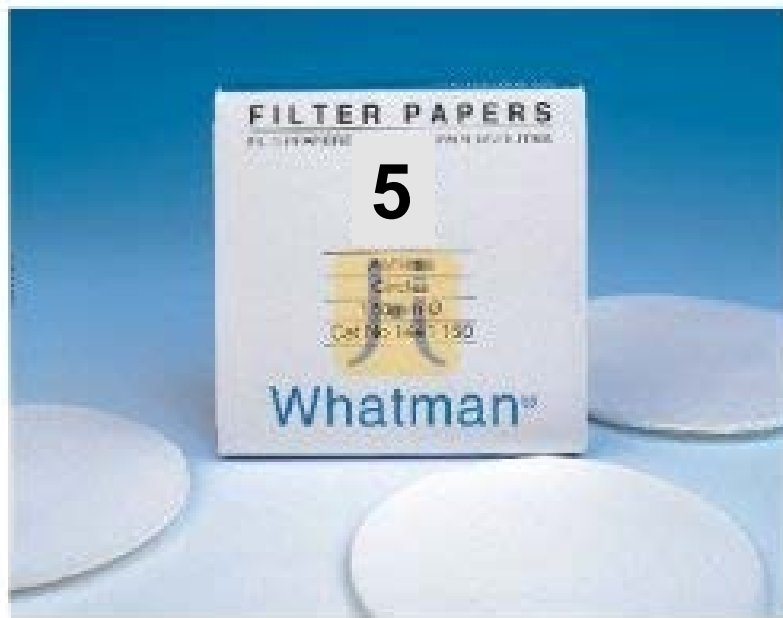
Cinta extensible de laboratorio



Cinta extensible de cocina



## Papel de filtro (germinación c. de Petri)



## Bayeta



## Papel de filtro (almacenamiento de las cepas)



## Filtro a café



Gasa (tipo Hansaplast®)  
(filtración de las esporas)



Trocitos de velo blanco  
transparente para cortina





# Silicagel



Litera para gato  
reutilizable después de secado  
a 200 °C (si no utilizada por un  
gato 😊)



## Extracto de levadura



## Levadura de panadero



# Gelatina de laboratorio



# Gelatina de cocina



Alcohol 90° de laboratorio



Alcohol a 90° de hogar





## Hipoclorito de sodio (desinfección)



## Lavandina



©rédito foto

## Arroz

M. Vales

J. Milazzo

H. Adrey

C. Tertois

D. Tharreau

## Trigo

E. Guzmán

M. Vales



Gracias  
Sulpayki  
Aguyje  
Merci  
Arigato

Thank you  
Obrigado

Grazie  
Συχαριστώ  
Danke  
A ni kié  
спасибо





# Preguntas ?

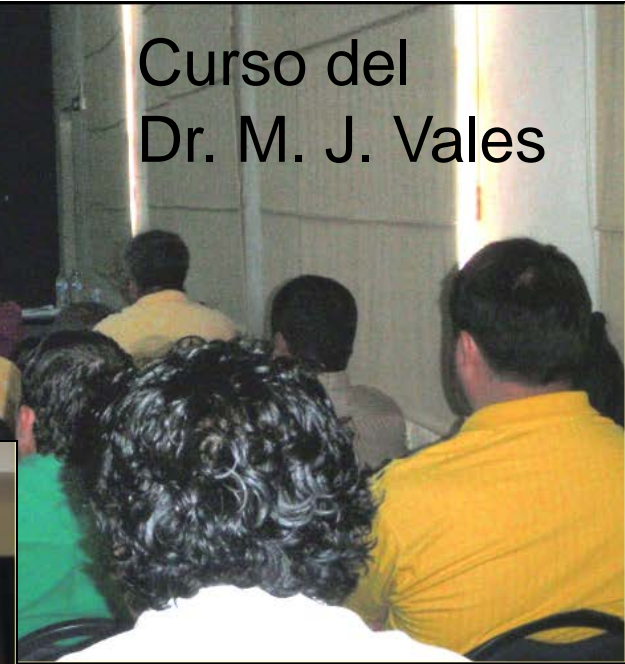




28 participantes  
al curso y 15 a  
las demostra-  
ciones



Curso del  
Dr. M. J. Vales



Demostraciones  
por la Ing.  
J. Milazzo